

Zum Vorkommen von Listerien
in Käse, Fleisch und Fleischwaren

Erhard Erdle

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554816_0090

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Zum Vorkommen von Listerien
in Käse, Fleisch und Fleischwaren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Erhard Erdle
aus
Krumbach

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. M. Rüsse
Referent:	Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent:	Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Rambeck

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Meinen Eltern
und
Angelika

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1 Allgemeines über die Gattung Listeria und die Listeriose bei Mensch und Tier	2
2.1.1 Kurzbeschreibung	2
2.1.2 Taxonomie, in ihrer chronologischen Entstehung und heute gültigen Form	4
2.2 Listerien in Milch und Milchprodukten	12
2.2.1 Vorkommen in Käse	12
2.2.2 Verhalten in bezug auf Überlebensfähigkeit und Wachstum in der Milch, während der Verarbeitung und in den Endprodukten	19
2.2.3 Hitzeresistenz, vor allem im Hinblick auf die Milchpasteurisierung	24
2.3 Listerien in Fleisch und Fleischwaren	36
2.3.1 Vorkommen	36
2.3.2 Verhalten	40
3. Eigene Untersuchungen	44
3.1 Material	44
3.1.1 Untersuchungsmaterial	44
3.1.2 Zur Listeriendiagnostik verwendete Nährmedien und Reagenzien	46
3.1.3 Zur Bestimmung der Phosphataseaktivität im Käse verwendete Chemikalien und Gerätschaften	49

3.2	Methodik	50
3.2.1	Listeriennachweis im Käse	50
3.2.1.1	Isolierung	50
3.2.1.2	Bestimmung der Listerienmenge	56
3.2.1.3	Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in Kaseproben	58
3.2.2	Listeriennachweis in zerkleinerten Fleisch- und Wurstproben	60
3.2.2.1	Isolierung	60
3.2.2.2	Bestimmung der Listerienmenge	60
3.3	Ergebnisse	61
3.3.1	Listeriennachweis im Käse	61
3.3.1.1	Isolierung	61
3.3.1.2	Bestimmung der Listerienmenge	65
3.3.1.3	Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in Käseproben	67
3.3.2	Listeriennachweis in zerkleinerten Fleisch- und Wurstproben	71
3.3.2.1	Isolierung	71
3.3.2.2	Bestimmung der Listerienmenge	74
4.	Besprechung der Ergebnisse und Diskussion	76
5.	Zusammenfassung	87
	Summary	89
6.	Literaturverzeichnis	91

1. Einleitung

Durch den Genuß von mit *Listeria* (L.) *monocytogenes* kontaminierten Nahrungsmitteln kam es in Nordamerika in den letzten Jahren wiederholt zu epidemiologischen Listerioseausbrüchen. Das dadurch ausgelöste Interesse, vor allem nach einem durch Käse mexikanischer Art verursachten Ausbruch, richtete sich zunächst auch hierzulande überwiegend auf das Vorkommen von *L. monocytogenes* in Milch und Milchprodukten. Positive Befunde, die an diesem Institut überwiegend bei Untersuchungen an ausländischen Produkten erhoben wurden, warfen die Frage auf, ob und in welchem Umfang auch deutsche Käsesorten mit Listerien kontaminiert sind und inwieweit auch andere Lebensmittel tierischen Ursprungs, speziell Fleisch sowie fermentierte Fleischwaren, bei denen u. U. ähnliche Versuchsbedingungen für Listerien wie bei Käse gegeben sind, betroffen sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine Erhebung über das Vorkommen von Listerien, insbesondere *L. monocytogenes*, in inländischem Käse, ferner in zerkleinertem Fleisch (Hackfleisch und Tatar) sowie streichfähigen und schnittfesten Rohwürsten durchgeführt.

Gleichzeitig sollte festgestellt werden, ob evt. Listerien enthaltender Käse aus ausreichend erhitzter Milch hergestellt worden war.

2. Schrifttum

2.1 Allgemeines über die Gattung *Listeria* und die Listeriose bei Mensch und Tier

2.1.1 Kurzbeschreibung (in Anlehnung an AMTSBERG, 1980)

- Erstbeschreibung: 1926 durch MURRAY, WEBB und SWANN:
"Bacterium monocytogenes"
- Einordnung: in der 1. Auflage von BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (1986), ist *Listeria* als Gattung unter den "regulären", nichtsporenbildenden, grampositiven Stäbchen aufgeführt
- Morphologie: kleines, kokkoides, an den Enden abgerundetes Stäbchen, das weder Sporen, noch Kapseln bildet. Kulturen können in Glatt-(S), Rauh-(R) und Intermediärform auftreten. In Rauhform ist Fadenbildung möglich
- Beweglichkeit: differentialdiagnostisch wichtiges Merkmal ist die taumelnde Bewegung, die bei einer Züchtungstemperatur von 20 - 25°C am ausgeprägtesten ist;
4 peritrich angeordnete Geißeln

Kulturelle Eigenschaften:	anspruchslos; Wachstum auf allen gebräuchlichen Nährböden; Wachstum in einem Temperaturbereich von 3 - 45°C mit einem Optimum zwischen 30 - 37°C; Wachstum in einem pH-Bereich von 5,6 - 9,6; aerob-mikroaerophil
Biochemische Eigenschaften:	Unterschiede in der Kohlenhydratspaltung und im Hämolysebildungsvermögen erlauben bedingt eine Differenzierung der verschiedenen Arten der Gattung <i>Listeria</i>
Tenazität:	Kochsalzkonzentrationen von 6 - 24 % werden mehrere Wochen überlebt; die Widerstandsfähigkeit in der Außenwelt ist beträchtlich (im Teichwasser bei 2 - 8°C bis zu 928 Tagen); Wachstum bei Kühlschranktemperaturen (4°C) möglich
Vorkommen:	<i>Listerien</i> kommen ubiquitär vor. Das Wirtsspektrum reicht vom Menschen über Haustiere und Vögel bis zu Kaltblütern und Insekten. Sie werden vielfach in der Natur gefunden, z.B. im Boden, auf Pflanzen und im Gewässerschamm
Krankheitsformen beim Haustier:	- zerebellare Form - metrogene Form - septikämische Form - daneben noch Keratokonjunktivitis und Mastitis (<i>Listeriosen</i> werden beim Haustier nur durch <i>L. monocytogenes</i> und <i>L. ivanovii</i> hervorgerufen)

Humanmedizinische
Bedeutung:

eine im allgemeinen seltene Infektionskrankheit durch *L. monocytogenes*, die sporadisch auftritt (z.B. bei herabgesetzter Abwehrkraft)
folgende Erscheinungsformen sind möglich:

- akut septische Form
- Listeriose des ZNS
- glanduläre Form
- lokale Form
- chronisch-septische Form mit isoliertem Organbefall

Listerien sind bei 1 - 3 % der Menschen (einschl. Schwangere) passagere Stuhlkeime (SEELIGER, 1981)

2.1.2 Taxonomie, in ihrer chronologischen Entstehung und heute gültigen Form

Im Jahre 1926 beschrieben MURRAY et al. eine in Cambridge in einem Versuchskaninchenbestand ausgebrochene Seuche und gaben dem ursächlichen Keim den Namen *Bacterium monocytogenes*, da dieser in der Lage war, in infizierten Tieren eine Monozytose auszulösen. Unabhängig davon fand PIRIE 1927 in Südafrika bei Wüstenspringmäusen mit ausgedehnten Lebernekrosen die gleiche Keimart. In Verehrung von Lord Lister gab er dem Bakterium den Namen *Listerella hepatolytica*. Nach der Feststellung, daß beide Keime identisch waren, wurden sie als *Listerella monocytogenes* bezeichnet. Später wurde bekannt, daß der Gattungsname *Listerella* bereits für eine Pilzart vergeben war, und es erfolgte 1940 auf Vorschlag PIRIE's die Umbenennung in *Listeria monocytogenes*.

An den im Laufe der Jahre immer häufiger isolierten Listerienstämmen wurden alsbald serologische Untersuchungen über die Antigenzusammensetzung durchgeführt. Während JULIANELLE und PONS 1939 noch von zwei serologischen Gruppen sprachen, teilte PATERSON 1940 die verschiedenen Stämme aufgrund der Unterschiede im Aufbau der Körper (O)- und Geißel (H)-antigene bereits in vier Agglutinationstypen ein.

Tabelle 1: Antigenstruktur von *L. monocytogenes*
(PATERSON, 1940)

Typ*	Geißelantigenfaktoren	Körperantigenfaktoren		
1	AB	I	II	(III)
2	BD	I	II	(III)
3	AB		II	IV (III)
4	ABC			V (III)

*) Serovar

Im Laufe der Zeit wurde dieses serologische Schema nach und nach erweitert, zu dem vor allem DONKER-VOET (1958, 1959, 1966 u. 1972) sowie SEELIGER und HOHNE (1979) wesentlich dazu beitrugen, wobei das heute gültige und in Tab. 2 dargestellte Schema entstand.

Parallel dazu wurden der Gattung *Listeria* neben der bestehenden Spezies *L. monocytogenes* die Arten *L. denitificans* (PREVOT, 1961), *L. grayi* (LARSEN und SEELIGER, 1966) und *L. murrayi* (WELSHIMER und MEREDITH, 1971) angegliedert.

Tabelle 2: Serovare von *L. monocytogenes sensu lato*, *L. grayi* und *L. murrayi* (in Anlehnung an SEELIGER, 1984a)

- Spezies *L. monocytogenes* (sensu lato)

Bezeichnung Paterson/Seeliger- Donker-Voet		O-Antigene					H-Antigene	
1	1/2a	I II (III)					A B	
	1/2b	I II (III)					A B C	
2	1/2c	I II (III)					B D	
3	3a	II (III) IV					A B	
	3b	II (III) IV				(XII XIII)	A B C	
	3c	II (III) IV				(XII XIII)	B D	
4	4a	(III)	(V)	VII	IX		A B C	
	4ab	(III)	V VI	VII	IX X		A B C	
	4b	(III)	V VI				A B C	
	4c	(III)	V	VII			A B C	
	4d	(III)	(V) VI		VIII		A B C	
	4e	(III)	V VI		(VIII) (IX)		A B C	
	5	(III)	(V) VI		(VIII)	X	A B C	
	7?	(III)					A B C	
	6a(4f)	(III)	V (VI) (VII)		(IX)		A B C	
	6b(4g)	(III)	(V) (VI) (VII)		IX X XI		A B C	
- Spezies <i>L. grayi</i>		(III)				XII	XIV	E
- Spezies <i>L. murrayi</i>		(III)				XII	XIV	E

Die Art *L. monocytogenes* wurde lange Zeit als einheitliche Spezies angesehen und nur aufgrund unterschiedlicher Oberflächenstrukturen, wie bereits erwähnt, in verschiedene Serovare eingeteilt. Es stellte sich jedoch heraus, daß anhand genetischer und biochemischer Merkmale eine weitere Aufteilung in fünf "genomic groups" möglich war (ROCOURT et al., 1982; ROCOURT et al., 1983).

Es erfolgte eine Aufgliederung in *L. monocytogenes* (MURRAY et al., 1926), *L. innocua* (SEELIGER, 1981), *L. welshimeri* (ROCOURT und GRIMONT, 1983), *L. seeligeri* (ROCOURT und GRIMONT, 1983) und *L. ivanovii* (SEELIGER et al., 1984); (Tab. 3).

Von diesen fünf Spezies zeichnen sich durch Hämolyse *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* und, in besonders starker Form, *L. ivanovii* aus, wohingegen *L. innocua* und *L. welshimeri* anhämolysisch sind (SEELIGER, 1986).

Als pathogen gelten nur *L. monocytogenes* und in geringerem Grade auch *L. ivanovii*, während *L. innocua*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* als völlig apathogen angesehen werden (HOF et al., 1986). PATOCKA et al. (1979) gelang es jedoch, mittels intrazerebraler Inokulation eines *L. innocua*-Stammes bei Saugmäusen eine lokalisierte Encephalitis hervorzurufen. Auch konnte *L. seeligeri* mehrmals aus pathologischem Material nachgewiesen werden (ROCOURT und SCHRETTENBRUNNER, 1985; SEELIGER, 1984b). Die Avirulenz eines *L. monocytogenes*-Stammes Serovar 1/2a dagegen stellte HOF 1984 fest.

Eine Mannit-Fermentierung findet ebenso wenig statt wie eine Nitratreduktion. Bezüglich der Xylose- und Rhamnose-vergärung ist das Verhalten dieser Spezies unterschiedlich: *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* bauen Xylose ab, *L. monocytogenes* und *L. innocua* dagegen nicht; Rhamnose wird von *L. monocytogenes* vergoren, von *L. ivanovii* und *L. seeligeri* nicht; *L. innocua* und *L. welshimeri* verhalten sich hier unregelmäßig (SEELIGER, 1986; ROCOURT, 1986).

Tabelle 3: Zuordnung der Serovare und biochemische Differenzierung der "genomic groups" von *L. monocytogenes* sensu lato in Anlehnung an ROCOURT et al. (1982)

"Genomic group"	Name	Serovar	β -Hämolyse ^a	Pathogenität ^b	Spaltung von			Nitrat-reduktion ^c
					Mannit ^a	Rhamnose ^a	Xylose ^c	
1	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"	+	+	-	+	-	-
2	<i>L. ivanovii</i>	5	++	+	-	-	+	-
3	<i>L. innocua</i>	6a, 6b, 4ab u.s. *	-	-	-	+/-	-	-
4	<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b	-	-	-	+/-	+	-
5	<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b** u.s.	+	-	-	-	+	-

^a) Daten von SEELIGER (1986)

^b) Daten von HOF et al. (1986)

^c) Daten von ROCOURT (1986)

u.s., undesignated serovar

*) nach KNORZ und HOF (1986) sind zu *L. innocua* auch einige Stämme der Serovarietät 3 zuzuordnen

**) Taxonomie dieses Stammes unsicher

Das entsprechende biochemische Verhalten von *L. murrayi* und *L. grayi* ist wie folgt charakterisiert: keine Hämolyse; apathogen; Mannit wird vergoren, Xylose nicht; *L. grayi* baut Rhamnose ab, *L. murrayi* verhält sich hier unregelmäßig. Bezüglich Nitrat differieren beide - während *L. murrayi* Nitrat in Nitrit umwandelt, geschieht dies bei *L. grayi* nicht (SEELIGER und JONES, 1986).

L. denitrificans ist anhamolytisch und mit Einschränkung apathogen. Es baut Mannit und Rhamnose nicht ab, fermentiert aber Xylose. Nitrat wird zu Nitrit umgesetzt (SEELIGER und JONES, 1986).

Tabelle 4: Biochemisches Verhalten von *L. grayi*, *L. murrayi* und *L. denitrificans* (SEELIGER und JONES, 1986)

Spezies	β -Hämolyse	Pathogenität	Spaltung von			Nitrat- reduktion
			Mannit	Rhamnose	Xylose	
<i>L. grayi</i>	-	-	+	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	-	+	+/-	-	+
<i>L. denitrificans</i>	-	-?	-	-	+	+

Unklarheit in der genauen taxonomischen Einordnung herrscht noch bei *L. grayi*, *L. murrayi* u. *L. denitrificans*.

So fanden STUART und WELSHIMER 1973 mittels Hybridisationsstudien einen geringen DNA-Verwandtschaftsgrad zwischen *L. monocytogenes sensu lato* auf der einen und *L. grayi* und *L. murrayi* auf der anderen Seite und forderten, *L. grayi* und *L. murrayi* aus dem Genus *Listeria* herauszunehmen und einen neuen Genus mit dem Namen "Murraya" zu schaffen (STUART und WELSHIMER, 1973; STUART und WELSHIMER, 1974).

FIEDLER und SEGER (1983) verweisen dagegen auf das Auftreten desselben Murein-Typs bei *L. monocytogenes*, *L. grayi* u. *L. murrayi* und sind für einen Verbleib von *L. grayi* und *L. murrayi* im Genus *Listeria*.

Neuere Studien von ROCOURT et al. (1987) deckten enge verwandtschaftliche Beziehungen im "16 S ribosomal ribonucleid

acid oligonucleotid catalog" von *L. murrayi* und *L. monocytogenes* auf und sprechen somit ebenfalls gegen einen Aus-schluß von *L. murrayi* (und der nahe verwandten Spezies *L. grayi*) aus der Gattung *Listeria*. Die Untersucher sind der Meinung, daß es sich beim Genus *Listeria* um zwei verwandte aber offensichtlich verschiedene Abstammungslinien handelt, wobei die eine durch *L. monocytogenes sensu lato* und die andere durch *L. grayi* u. *L. murrayi* dargestellt wird.

Bei *L. denitrificans* herrscht heute allgemeines Einverständnis darüber, daß diese Art kein Mitglied des Genus *Listeria* ist (SEELIGER und JONES, 1986). Dies wird unter anderem auch schon durch vergleichende Untersuchungen von FIEDLER und SEGER (1983) über den Murein-Aufbau festgestellt.

Auch die Ergebnisse von "16 S rRNA cataloging" erbrachten weder Ähnlichkeiten von *L. denitrificans* mit *L. monocytogenes* noch mit anderen benachbarten Genera (ROCOURT et al., 1987). Die Untersucher gehen deshalb sogar einen Schritt weiter und befürworten die Bildung eines neuen Genus mit dem Namen *Jonesia* gen. nov. und dem Typstamm *Jonesia denitrificans* comb. nov..

Diese Ergebnisse wurden auch von SEELIGER und JONES (1986) berücksichtigt, als sie die taxonomische Einteilung der Listerien in der neuesten Ausgabe des BERGEY'S MANUAL'S (1986) beschrieben:

Tabelle 5: Taxonomische Einordnung des Genus *Listeria*
(SEELIGER und JONES, 1986)

Species	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Listeria innocua</i>
	<i>Listeria ivanovii</i>
	<i>Listeria seeligeri</i>
	<i>Listeria welshimeri</i>
Species Incertae Sedis	<i>Listeria grayi</i> *
	<i>Listeria murrayi</i> *
	<i>Listeria denitrificans</i> **

*) Zuordnung zur Gattung *Listeria* noch nicht endgültig
geklärt

**) wird nicht mehr der Gattung *Listeria* zugeordnet; die
anderweitige taxonomische Eingliederung ist aber
noch nicht geklärt

2.2 Listerien in Milch und Milchprodukten

Es ist vorstellbar, daß auch listerienhaltige Rohmilch für das Vorkommen von Listerien in Käse, insbesondere wenn dieser aus nicht wärmebehandelter Milch hergestellt wird, verantwortlich ist. Interessant sind deshalb in diesem Zusammenhang Untersuchungen über das Vorkommen von Listerien in der Käseereimilch. Da eine Bearbeitung dieses Themas über den Rahmen dieser Arbeit hinausginge, sei an dieser Stelle auf GASPAROVIC (1988) und dessen Ausführungen verwiesen.

2.2.1 Vorkommen in Käse

Anlaß für umfangreiche Untersuchungen über das Vorkommen von *L. monocytogenes* im Käse war eine Listeriose-Epidemie in Kalifornien, in der von Januar bis Juni 1985 86 Menschen, darunter 58 Mutter-Kind-Paare, verwickelt waren. 29 Erwachsene, Neu- und Ungeborene starben. Infektionsquelle war ein "Mexican-Style"-Käse, der nur unter Labzusatz hergestellt worden war. Aus ihm konnte wie auch aus dem pathologischen Material der Infizierten der Serotyp 4b isoliert werden (JAMES et al., 1985).

Die darauffolgenden Untersuchungen der Food and Drug Administration (FDA) ergaben sowohl bei in eigenem Lande produziertem Weich- und halbfestem Schnittkäse als auch bei importiertem französischem Brie-Käse das Vorkommen von *L. monocytogenes* und führten verschiedentlich zu Rückrufaktionen (LECOS, 1986; TERPLAN et al., 1986).

Bei der Überprüfung von 357 Molkereien durch die FDA konnten in den Produkten von neun Firmen (2,5 %) *L. monocytogenes* entdeckt werden. Nachforschungen zeigten, daß die Kontamination nach der Pasteurisierung erfolgt war (ANONYM, 1986b).

BREER (1986a) führte Untersuchungen an 25 Hart- und Schnittkäsen, fünf Sauermilchkäsen und 70 Weichkäsen durch. Die Hart-, Schnitt- und Sauermilchkäse erwiesen sich als negativ, während 16 der 70 Weichkäse, von denen 31 aus pasteurisierter und 39 aus unerhitzter Milch hergestellt worden waren, Listerien enthielten (22,9 %). Es entfielen neun auf *L. monocytogenes* (12,9 %) und sieben auf *L. innocua* (10,0 %), wobei die Art der Ausgangsmilch - roh oder pasteurisiert - keine Rolle spielte. MPN-Bestimmungen ergaben meist Listerienzahlen zwischen 0,1/g und 10/g. Die Listerien ließen sich zudem nur in der Rinde und nicht im Innern der Käse nachweisen.

Aus weiteren 1004 Proben von Weich-, halbfestem Schnitt- und Hartkäse, vor allem aus der Schweiz und aus Frankreich stammend, konnte BREER (1986b) in insgesamt 96 Fällen (9,6 %) Listerien züchten, wobei 50 auf *L. monocytogenes* und 46 auf *L. innocua* entfielen. Die größte Isolierungsrate an *L. monocytogenes* verzeichnete er hierbei bei den 604 untersuchten Weichkäsen mit allein schon 33 Isolierungen aus solchen mit schmieriger Oberfläche, während in den 205 halbfesten Schnittkäsen *L. monocytogenes* nur viermal vorkam und die 88 Hartkäseproben überhaupt keine Listerien enthielten. Wiederum hatte die Art der verwendeten Milch, ob hitzebehandelt oder nicht, keinen Einfluß auf die Isolierungsrate. Die *L. monocytogenes*-Zahlen lagen im Bereich von < 10/g bis 4×10^4 /g.

Auch in einer weiteren Untersuchung an 144 Käseproben fand BREER (1986c) in 28 listerienpositiven Proben (19,4 %) zwölfmal *L. monocytogenes* (8,3 %) und 16mal *L. innocua* (11,1 %). Neun *L. monocytogenes*-Stämme stammten dabei aus 57 Rotschmierekäse, davon sechs aus 29 Käsen aus pasteurisierter und drei aus 28 Käsen aus nichtpasteurisierter Milch; die restlichen drei *L. monocytogenes*-Stämme wurden aus den 40 Weißschimmelkäsen aus nichtpasteurisierter Milch

isoliert. In den elf aus unerhitzter Milch hergestellten Weißschimmelkäse und den 27 Hart- und Schnittkäse sowie den neun Sauermilchkäse wurde *L. monocytogenes* nicht gefunden.

GLEDEL (1986) untersuchte 330 Proben aus Rohmilch hergestellter und 873 Proben aus pasteurisierter Milch hergestellter Weichkäse auf *Listerien*. Bei ersteren waren zehn Proben positiv, davon drei mit *L. monocytogenes*, bei letzteren wies er in 20 Proben *Listerien* nach mit zwölf *L. monocytogenes*-Isolaten. Während in 126 untersuchten Blauschimmelkäse-Proben keine *Listerien* nachweisbar waren, konnte er den Keim auch aus zwei von 149 Proben Hüttenkäse (beide Male *L. monocytogenes*) und aus zwölf von 289 Schnittkäsen (in zehn Fällen *L. monocytogenes*-Stämme) isolieren.

In Kanada untersuchten JOHNSTON et al. (1986) 211 Weich- und halbfeste Schnittkäse von 38 kanadischen und 60 ausländischen Herstellern auf *Listerien*. Zwei Käse aus Frankreich enthielten *L. monocytogenes*, einer, ebenfalls aus Frankreich stammend, enthielt *L. innocua*.

TERPLAN et al. (1986) isolierten aus 706 Käseproben des Handels aus verschiedenen Ländern 58mal *Listerien* (8,2 %), darunter *L. monocytogenes* in elf Weichkäsen, sechs halbfesten Schnittkäsen und einem Filatakäse (= insgesamt 2,5 %). *L. innocua* konnte 35mal und *L. seeligeri* fünfmal nachgewiesen werden. Die Befunde verteilten sich sowohl auf Käse aus pasteurisierter Milch als auch auf Käse aus roher Milch. Käse mit schmieriger Oberfläche waren häufiger betroffen als solche mit Außenschimmel. Die höchste Kontaminationsrate mit 54,5 % wies Sauermilchkäse auf, wobei es sich immer nur um *L. innocua* handelte. Bei Hart-, Schmelz- und Frischkäse (im engeren Sinne) verliefen die Untersuchungen auf *Listerien* negativ. Die über das MPN-Verfahren einmalig ermittelte Menge lag unter 1 L.m./g. Auch hielten

sich die Listerien nur in den Oberflächenschichten der Käse auf.

Diese Untersuchungen dehnten SCHOEN und TERPLAN (1987) auf 1490 Kaseproben aus und isolierten hieraus den Keim in 159 Fällen (10,7 %); in 53 Fällen handelte es sich um *L. monocytogenes* (3,6 %). Wenn auch jetzt Listerien in drei von 42 Hartkäseproben gefunden wurden, wobei es sich um zwei *L. monocytogenes*-Isolierungen aus Schafkäse handelte, (und der Filatakäse diesmal den Weichkäsen zugeordnet wurde), so entsprachen doch die Prozentzahlen der Listerien- bzw. *L. monocytogenes*-Isolierungen in etwa denen der vorangegangenen Untersuchungen. Sauermilchkäse und Weichkäse wiesen auch hier wieder die höchsten Listerien-Kontaminationsquoten auf.

Holländische Untersucher ermittelten aus 69 aus Frankreich importierten Weichkäsen, die teils aus pasteurisierter, teils aus roher Milch hergestellt worden waren, zehnmal *L. monocytogenes*. Die Listerienzahlen lagen zwischen 10^3 /g und 10^6 /g, und die positiven Käse waren alle aus roher Milch produziert worden (BECKERS et al., 1987).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Autoren zum Vorkommen von Listerien in Käse gibt Tab. 6 wieder.

Angefügt sei hier noch der Bericht von DOYLE und SCHOENI (1987). Sie unterzogen 90 Proben von weichem oberflächengereiftem Käse aus einer Charge, die schon als listerienhaltig identifiziert worden war, erneut einer Nachuntersuchung, um einige Isolierungsverfahren miteinander zu vergleichen. Dabei wurden von ihnen 41 der 90 Käseproben als *L. monocytogenes*-positiv befunden.

Tabelle 6: Vorkommen von *L. monocytogenes* im Käse

	Anzahl untersuch- ter Proben	davon Listerien- positiv (%)	<i>L. mono- cytogenes</i> - positiv (%)	<i>L. in- nocua</i> - positiv (%)	Autor
Hart- u. Schnittkäse	25	0			
Sauermilchkäse	5	0			BREER
Rotschmierenkäse	39	13	7	6	(1986a)
Weißschimmelkäse	31	3	2	1	
Hartkäse	88	0			
Halbfester Schnittkäse	205	8 (4,0)	4 (2,0)	4 (2,0)	
Rotschmierenkäse	343	66 (19,2)	33 (9,6)	33 (9,6)	BREER
Weißschimmelkäse	261	12 (4,6)	7 (2,7)	5 (1,9)	(1986b)
Frischkäse	48	4 (8,3)	0	4 (8,3)	
andere	59	6 (10,2)	6 (10,2)	0	
Hart- u. Schnittkäse	27	} 28 (19,4)	0	} 16 (11,1)	BREER (1986c)
Sauermilchkäse	9		0		
Rotschmierenkäse	57		9		
Weißschimmelkäse	51		3		
Schnittkäse	289	12 *	10	1	
Weichkäse	1203	30 *	15	11	GLEDEL
Hüttenkäse	149	2	2	0	(1986)
*blue cheese	126	0			
Weich- u. halbfester Schnittkäse	111	3	2	1	JOHNSTON et al, (1986)

Fortsetzung Tabelle 6:

	Anzahl untersuch- ter Proben	davon Listerien- positiv (%)	L. mono- cytogenes- positiv (%)	L. in- nocua- positiv (%)	Autor
Hartkäse	16	0			
Schnittkäse	113	1 (0,9)	0	1 (0,9)	
Halbfester ** Schnittkäse	160	14 (8,8)	6 (3,8)	3 (1,8)	
Sauermilchkäse	11	6 (54,5)	0	6 (54,5)	
Weichkäse mit Oberfl'schmiere	64	20 (31,3)	6 (9,4)	14 (21,9)	TERPLAN
Weichkäse mit Oberfl'schimmel	215	15 (7,0)	5 (2,3)	10 (4,7)	et al, (1986)
Weichkäse ohne Oberfl'flora	40	1 (2,5)	0	1 (2,5)	
Frischkäse	69	1 (1,4) ***	1 (1,4)	0	
Schmelzkäse	18	0			
Weichkäse ****	69		10		BECKERS et al, (1987)

*) rechnerische Differenzen ergeben sich aus der fehlenden Angabe
über die Isolierung anderer Listeria-Spezies

**) fünf hieraus isolierte L. seeligeri-Stämme sind in der Tabelle
nicht angeführt

***) Filatakäse

****) es lagen keine weiteren Angaben vor

Tabelle 7: Vorkommen von Listerien im Weichkäse in Abhängigkeit von der Verwendung roher oder pasteurisierter Milch zur Käseherstellung

	Anzahl untersuch- ter Proben	davon Listerien- positiv (%)	L. mono- cytogenes- positiv (%)	L. in- nocua- positiv (%)	Autor
pasteurisiert	31	7 (22,6)	4 (12,9)	3 (9,7)	BREER
unerhitzt	39	9 (23,1)	5 (12,8)	4 (10,3)	(1986a)
pasteurisiert	122	26 (21,3)	9 (7,4)	17 (13,9)	BREER
unerhitzt	83	16 (19,3)	8 (9,6)	8 (9,6)	(1986b)
pasteurisiert	40		6		BREER
unerhitzt	68		6		(1986c)
pasteurisiert	873	20	12	5 *	GLEDEL
unerhitzt	330	10	3	6	(1986)
pasteurisiert				**	TERPLAN
unerhitzt					et al. (1986)
pasteurisiert	36		0	***	BECKERS
unerhitzt	14		9 (65)		et al. (1987)

*) rechnerische Differenzen ergeben sich aus der fehlenden Angabe über die Isolierung anderer Listeria-Spezies

**) Autoren geben an, daß Listerien sowohl bei Käse aus roher als auch aus pasteurisierter Milch nachweisbar waren

***) Autoren geben an, daß sie keine Informationen über die Art der verwendeten Milch bei den 19 restlichen Käseproben besitzen, aus denen sie bei einer L. monocytogenes züchten konnten

2.2.2 Verhalten in bezug auf Überlebensfähigkeit und Wachstum in der Milch, während der Verarbeitung und in den Endprodukten

Den Nachweis, daß Listerien sehr lange Zeit in Milch überleben können, brachte WARNECKE 1963, indem er Listerien in künstlich infizierter Milch bis zu 748 Tagen nachweisen konnte.

DIJKSTRA (1971) verwendete bei seinen Versuchen natürlich infizierte Milch und bewahrte sie bei 5°C auf. Nach einem halben Jahr fielen elf Prozent der 36 Proben und nach zwei bis drei Jahren 56 % negativ aus.

In einem weiteren Versuch mit 72 Milchproben unter gleichen Bedingungen waren innerhalb eines Jahres bereits ca. 50 % der Proben listerienfrei. In 31 % der Milchproben überlebten Listerien jedoch neun bis elf Jahre und in sechs Prozent sogar bis zu dreizehn Jahre (DIJKSTRA, 1975).

Grund für das lange Überleben von Listerien in Milch sieht BARZA (1985) darin, daß Listerien durch ihre fakultativ intrazelluläre Lage in den Leukozyten einen gewissen Schutz vor den antimikrobiellen Substanzen der Milch, z.B. Gamma-Globulinen, Lysozym und Peroxidase erhalten.

Auch in "gesauerter Milch" sollen sich nach DEDIE (1955) Listerien bei Zimmertemperatur gut vermehren können.

Genauere Angaben liegen hierüber von SIELAFF (1966) vor. Er konnte in mehreren Versuchen feststellen, daß die Keime in natürlich gesauerter Milch bei einem pH unter 4,2 abstarben. In natürlich gesauerter Milch, die bei 4°C aufbewahrt wurde, konnten die Listerien bei einem pH von 4,2 bis zu sieben Tagen, bei einem pH von 4,3 mehr als acht Tage und bei einem pH-Wert von 4,5 bis 6,4 noch nach 27 Tagen nachgewiesen werden.

DONNELLY und BRIGGS (1986) verglichen das Wachstum der L. monocytogenes-Stämme der Serovarietät 1,3 und 4b in Milch

mit 11 % fettfreier Trockenmasse, Magermilch und Vollmilch bei 4, 10, 22 und 37°C. Dabei stellten sie verstärktes psychrotrophes Wachstum von Serotyp 4b in Vollmilch im Vergleich zu den anderen beiden Medien fest. Besonders ausgeprägt war dies bei einer Temperatur von 10°C, bei der eine Zunahme von $7,9 \times 10^0$ auf $5,8 \times 10^6$ CFU/ml innerhalb von 48 Stunden zu verzeichnen war. Bei den Serotypen 1 und 3 war das Wachstum in allen Medien etwa gleich. In Vollmilch bei 10°C wurden im Vergleich zu Serovarietät 4b jedoch nur Keimzahlen von 10^3 CFU/ml innerhalb 48 Stunden erreicht. Die Autoren sahen Parallelen zu den Listerioseausbrüchen 1983 in Massachusetts und 1985 in Kalifornien, bei denen *L. monocytogenes* Serotyp 4b und als Infektionsquelle fetthaltige Milchprodukte verwickelt waren. Auch weisen sie darauf hin, daß die in den Tanks der Milchsammelastzüge gesammelte Milch durch das ständige Zufügen frisch ermolkener Milch nicht rasch genug auf entsprechende Temperaturen heruntergekühlt wird und somit Temperaturen ausgesetzt ist, die den Listerien gute Vermehrungsmöglichkeit bieten.

ROSENOW und MARTH (1987) bebrüteten mehrere *L. monocytogenes*-Stämme in Mager-, Voll- und Schokoladenmilch sowie in Schlagsahne, um den Einfluß von Stamm, Produkt und Temperatur auf das Wachstum der Keime zu beobachten. Die Wachstumsrate von *L. monocytogenes* war in allen vier Produkten bei einer gegebenen Temperatur etwa gleich und nahm mit steigender Temperatur zu. Die Generationszeiten reichten von mehr als 37 Stunden bei 4°C über fünf bis sechs Stunden bei 13°C bis zu 41 Minuten bei 35°C. Die maximale Keimzahl von mindestens 10^7 Zellen/ml (bei Schokoladenmilch 10^8 Zellen/ml) wurde letztlich bei jeder Temperatur erreicht.

Über das Verhalten von Listerien während des Herstellungsprozesses von Milchprodukten und über den Verbleib der Keime in den fertigen Produkten stellten mehrere Autoren Untersu-

chungen an:

DOYLE et al. (1985) stellten während der Sprühtrocknung von sowohl konzentrierter (30 % Trockensubstanz) als auch unkonzentrierter Magermilch, die mit ca. 10^5 bis 10^6 L. monocytogenes/ml beimpft worden war, eine Reduktion der Keimzahl in einer Größenordnung von ca. 1 bis $1,5 \log_{10}$ L. monocytogenes/g fest. Der erreichte Trockensubstanzgehalt lag bei 93,7 bis 96,4 %. Bei der anschließenden Lagerung der Trockenmilch in feuchtigkeitsresistenten Folien bei 25°C starben die noch vorhandenen Organismen innerhalb 16 Wochen ab.

RYSER et al. (1985) sowie RYSER und MARTH (1987a, 1987b) untersuchten die Überlebensfähigkeit der Listerien bei der Herstellung verschiedener Kasesorten. Sie setzten dabei der jeweils verwendeten pasteurisierten Milch eine entsprechende L. monocytogenes-Menge zu; ansonsten erfolgte die Herstellung nach den üblichen Standards.

Die Hüttenkäseproduktion (1985) überlebten nur wenige der initial zugesetzten L. monocytogenes. Während der anschließenden Lagerung bei 3°C blieben sie bis zu 28 Tage lebensfähig.

Während der Cheddar-Käse-Herstellung (1987a) blieben die L. monocytogenes-Zahlen relativ konstant. In den ersten zwei bis drei Wochen der Reifung erfolgte dann eine leichte Zunahme, anschließend nahm die L. monocytogenes-Zahl wieder ab. Je nach verwendetem L. monocytogenes-Stamm ergab sich eine Persistenz von 154 bis 434 Tagen im Cheddarkäse von normaler Zusammensetzung.

Eine fünf- bis zehnfache Zunahme der zugesetzten L. monocytogenes-Menge war 24 Stunden nach der Herstellung von Camembert-Käse (1987b) zu verzeichnen. Während der ersten 18 Tage Reifung erfolgte dann je nach verwendetem L. monocytogenes-Stamm eine 10- bis 100-fache Abnahme oder ein Gleichbleiben der L. monocytogenes-Zahl, um anschließend

wieder kraftig zuzunehmen. Nach 65 Tagen Reifung wurden bis zu 5×10^7 CFU/g gezählt - bei einer Ausgangsmenge von 5×10^2 Keimen/ml. Das Listerienwachstum verlief parallel zum pH-Anstieg. Die Organismen waren ungleich mehr in den Oberflächenschichten als im Innern des Käses anzufinden.

In den Versuchen von TERPLAN et al. (1986) zur Dynamik von *L. monocytogenes* in Außenschimmel- und Rotschmierekäse, jeweils hergestellt aus künstlich kontaminierter Milch, zeigte sich, daß die Keime mit zunehmender Sauerung des Bruches weitgehend verschwinden, mit der Entsauerung vor allem in den Oberflächenschichten aber wieder auftreten, und sich erheblich vermehren. Niedrige pH-Werte im Bruch um 4,8 über einige Tage reichten nicht aus, um *L. monocytogenes* vollständig abzutöten.

Zwei Arbeiten aus Bulgarien und eine aus Jugoslawien befassten sich ebenfalls mit diesem Thema.

SIPKA et al. (1974) beobachteten während der Herstellung von "white brined cheese" eine Abnahme der ursprünglich 240 pro ml Ausgangsmilch vorhandenen *L. monocytogenes*-Keime; darauf folgte eine Zunahme auf 1.02×10^6 Keime/g, und ab dem 14. Tag der Reifung gingen die Zellen dann allmählich wieder zurück und lagen, als die Käsureifung abgeschlossen war, bei $1,34 \times 10^5$ Keimen/g.

Nach Angaben von STAJNER et al. (1979) überlebte *L. monocytogenes* sieben Tage Kühlagerung in "cultured cream" und "small skim-milk unsalted cheese", die beide aus natürlich infizierter Milch hergestellt worden waren.

Bei einer Reifungstemperatur von 18-22°C konnten Listerien im "Kachkaval"-Käse bis zu 70 Tage und im "white pickled"-Käse bis zu 30 Tage nachgewiesen werden (IKONOMOV und TODOROV, 1964).

Abschließend sollen hier noch die Beobachtungen von BREER (1986b) angeführt werden. Ihm war aufgefallen, daß bei

manchen Firmen ein hoher Prozentsatz, bei anderen Firmen dagegen ein geringerer Prozentsatz an listerienhaltigem Käse entdeckt werden konnte. Auch mißlang bei Käse des öfteren der Listeriennachweis in der ersten Reifungswoche, während ab der zweiten Woche plötzlich, verbunden mit einem pH-Anstieg, Listerien isoliert werden konnten. Weitere Untersuchungen in den betreffenden Firmen offenbarten dann, daß die Regalbretter, auf denen die Käse reiften, und ebenso die Bürsten, mit denen die Käse geschmiert wurden, zu einem erheblichen Teil mit *L. monocytogenes* kontaminiert waren.

Diesen Sachverhalt konnten auch TERPLAN et al. (1986) bestätigen. Sie fanden in einem Betrieb, in dessen Produkten *L. innocua* nachgewiesen worden war, den gleichen Keim auch in den verschiedenen Produktionsbereichen, während ihnen dies in einem anderen Betrieb, dessen Produkte allesamt listerienfrei waren, nicht gelang. Die Autoren betonen die Möglichkeit der Kontamination eines Produktes im Verlaufe der Herstellung, wenn es solchen Keimen gelingt, sich gewissermaßen als "Betriebsflora" zu etablieren.

2.2.3 Hitzeresistenz, vor allem im Hinblick auf die Milchpasteurisierung

Untersuchungen zur Hitzeresistenz von Listerien begannen schon mit deren Entdeckung im Jahr 1926. Die angewandten Untersuchungstechniken waren zum Teil sehr verschieden, meist wurde auch noch kein Bezug zur Milchpasteurisierung hergestellt. Die Tab. 8 bis 12 zeigen die Ergebnisse entsprechender Erhitzungsversuche vor 1985.

Tabelle 8: Hitzeresistenzversuche -
Temperaturbereich: bis 59°C

Autor	Temperatur (°C)	Einwirkungszeit	Keimverhalten	Erhitzungsmedium / Apparatur
MURRAY et al, (1926)	47-48	1½-6 h	abgetötet ^{ab}	
	55	10-30 min	abgetötet ^b	Keimsuspension in a) "broth" b) 0,85 %ige NaCl-Lsg. / Wasserbad
	55	30-60 min	abgetötet ^a	
	58-59	< 10 min	abgetötet ^b	
	58-59	10-30 min	abgetötet ^a	
BARBER (1939)	55	30 min	überlebt	/ Anwendung von "feuchter Hitze"
	55	60 min	abgetötet	
ZELLER (1949)	50	2 h	überlebt	Serumbouillonkultur in Ampullen / Wasserbad
GORET u, OUDAR (1965)	55	30 min	überlebt	/ Anwendung von "feuchter Hitze"
	55	1 h	abgetötet	

Tabelle 9: Hitzeresistenzversuche -

Temperaturbereich: von 60 bis 69°C

Autor	Temperatur (°C)	Einwirkungszeit	Keimverhalten	Erhitzungsmedium / Apparatur
ZELLER (1949)	60	10 min	abgetötet	Serumbouillonkultur in Ampullen / Wasserbad
ÖZGEN (1951)	60	bis 12 min	überlebt	Bouillonkultur in Röhrchen
	60	15 min	abgetötet	/ Wasserbad
SCHOOP (1951)	60	10 min	abgetötet	in der Kultur gezüchtete Keime
ZINK et al. (1951)	60	10 min	überlebt	"broth"-Kultur mit $0,5 \times 10^8$ L./ml / Wasserbad
STENBERG u. HAMMÄINEN (1955)	63-65	5 min	abgetötet	Milch- u. Bouillon- kulturen
GORET u. DUDAR (1965)	60	12 min	überlebt	/ Anwendung von "feuchter Hitze"
	60	15 min	abgetötet	
IKONOMOV u. TODDROV (1967)	68	10 min	abgetötet	beimpfte Kuh- u. Schafmilch / tubulärer Glas- pasteurisierer

Tabelle 10: Hitzeresistenzversuche -

Temperaturbereich: von 70 bis 79°C

Autor	Temperatur (°C)	Einwirkungszeit	Keimverhalten	Erhitzungsmedium / Apparatur
STENBERG u. HAMMAINEN (1955)	73-75	10-30 s	überlebt	Milch- u. Bouillonkulturen
	73-75	2 min	abgetötet	
DEDIE (1955)	75	10 s	überlebt	beimpfte Vollmilch in Glaskapillaren mit 0,3 mm Ø / Wasserbad
	75	15 s	abgetötet	
GORET u. OUDAR (1965)	75	10 min	abgetötet	Keime in der Milch
IKONOMOV u. TODOROV (1967)	72	20 s	abgetötet ^a	^a) beimpfte Kuhmilch ^b) beimpfte Schafmilch mit $>30 \times 10^6$ L./ml / tubulärer Glas-pasteurisierer
	72	20 s	überlebt ^b	
IKONOMOV (1969)	70	20 s	abgetötet	beimpfte Schafmilch / tubulärer Glas-pasteurisierer
	72	20 s	abgetötet	
IKONOMOV (1969)	70	> 60 s	abgetötet	beimpfte Schafmilch in "test-tube" mit 16 mm Ø (Methode laut Autor ungeeignet)
	72	60 s	abgetötet	
OBIGER (1976)	71	23,4 s	abgetötet	beimpfte Magermilch / Röhrenerhitzer
STAJNER et al. (1979)	71	42 s	überlebt	beimpfte Kuhmilch mit 5×10^6 L./ml
	74	42 s	überlebt	

Tabelle 11: Hitzeresistenzversuche -

Temperaturbereich: von 80 bis 89°C

Autor	Temperatur (°C)	Einwirkungszeit	Keimverhalten	Erhitzungsmedium / Apparatur
POTEL (1950/51)	80	"rasch"	abgetötet	ohne Angaben
SEELIGER u. LINZENMEIER (1953)	80	> 10 s	abgetötet	ohne Angaben
POTEL (1953/54)	80	5 min	überlebt	ohne Angaben
OEDIE (1955)	85	1 s	abgetötet	beimpfte Vollmilch in Glaskapillaren mit 0,3 mm Ø / Wasserbad
STENBERG u. HAMMAINEN (1955)	80	3-5 s	abgetötet	Milch- u. Bouillon- kulturen
GORET u. OUDAR (1965)	85	1 min	abgetötet	Keime in der Milch
STAJNER et al. (1979)	85	15 s	abgetötet	beimpfte Kuhmilch mit 5×10^6 L./ml

Tabelle 12: Hitzeresistenzversuche -

Temperaturbereich: 90°C und höher

Autor	Temperatur (°C)	Einwirkungszeit	Keimverhalten	Erhitzungsmedium / Apparatur
ÖZGEN (1951)	100	45 s	überlebt	Bouillonkultur in Röhrchen / Wasserbad
	100	60 s	abgetötet	
ZINK et al. (1951)	100	5 min	überlebt	"broth"-Kultur mit >0,5 x 10 ⁹ L./ml / Wasserbad
	100	10 min	abgetötet	
JENTZSCH (1958)	100	25 s	abgetötet	Bouillonkultur / Wasserbad
STAJNER et al. (1979)	95	5 s	abgetötet	beimpfte Kuhmilch mit 5 x 10 ⁶ L./ml

So kontrovers die Ergebnisse der einzelnen Autoren sind, so kontrovers sind auch die Aussagen, die die Autoren zur Frage der Pasteurisierung ableiten.

Während SEELIGER und LINZENMEIER (1953), DEDIE (1955), BISPING (1957), KAMPELMACHER (1958) und AMTSBERG et al. (1969) der Meinung sind, daß die gebräuchlichen Pasteurisierungsverfahren zur Abtötung der Listerien in der Milch ausreichen und dies SEELIGER (1961), SIELAFF (1966), POTEL (1968) und OBIGER (1976) vor allem auf die Hoherhitzung, letzterer auch auf die Kurzzeiterhitzung, beziehen, wurde der Langzeitpasteurisierung von GORET und OUDAR (1965) und SEELIGER (1981), der Kurzzeiterhitzung von POTEL (1953/54 und 1955) und selbst der Hoherhitzung von HOF et al. (1986) eine Abtötung von Listerien aberkannt.

OZGEN (1951), POTEI (1955) und BISPING (1957) zogen daraus den Schluß, daß die unterschiedlichen Ergebnisse weitgehend durch die Versuchstechnik bedingt waren.

Dies konnten auch DEDIE und SCHULZE (1957) sowie SCHULZE (1957) zeigen (Tab. 13). Sie verglichen die Abtötungszeiten von *Listerien* in Röhrchen von verschiedener Weite. Bei Verwendung von 14 mm weiten Reagenzgläsern wurden bei 60°C 14 min und bei 80 bis 85°C fast eine Minute zur Abtötung benötigt. Dies entsprach auch den Ergebnissen anderer Autoren. Bei Verwendung von Kapillaren mit einer lichten Weite von 0,3 mm konnten dagegen mit einer Minute bei 60°C, < 10 sec bei 75°C und ungefähr einer Sekunde bei 85°C wesentlich kürzere Zeiten ermittelt werden. Die Autoren fanden die Kapillarmethode für Hitzeresistenzversuche am geeignetsten und kamen zu dem Schluß, daß übliche Hochoerhitzung für die Abtötung ausreichend ist, die Kurzzeiterhitzung dagegen einen zu geringen Spielraum zu haben scheint.

Nach BEARNS und GIRARD (1958) ist die Abtötung von *L. monocytogenes* durch die Pasteurisierung von der Zahl der vorliegenden Keime abhängig, denn ihre Versuche mit definierten Keimmengen zeigten, daß *L. monocytogenes* die Langzeitpasteurisierung (61,7°C; 35 min; 20 x 150 mm große Röhrchen) überlebten, wenn ihre initiale Zahl 5×10^4 lebensfähige Keime/ml überstieg. Der errechnete $D_{61,7^\circ\text{C}}$ -Wert lag bei 10,9 min. Dabei stellten sie keine Unterschiede in der Hitzeresistenz verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme fest; auch konnte kein Schutzeffekt der Milch im Vergleich zu Wasser als Erhitzungsmedium ausgemacht werden (Tab. 13).

Tabelle 13: Erhitzungsversuche von DEDIE und SCHULZE (1957), SCHULZE (1957) und BEARNS und GIRARD (1958)

Autor	Temperatur (°C)	Einwirkungszeit	D-Wert	Keimverhalten	Erhitzungsmedium / Methode
DEDIE u. SCHULZE (1957) u. SCHULZE (1957)	60	14 min		abgetötet	beimpfte Milch mit ca. 10^5 L./ml / Röhrchen mit 14 mm Ø
	80-85	fast 1 min		abgetötet	
	60	1 min		abgetötet	beimpfte Milch mit ca. 10^5 L./ml / Kapillaren mit 0,3 mm Ø
	75	< 10 s		abgetötet	
	85	1 s		abgetötet	
BEARNS u. GIRARD (1958)	61,7		10,9 min	abgetötet	< 5×10^4 L./ml Milch / Röhrchen mit 20 mm Ø (test tube)
	61,7		10,9 min	überlebt	> 5×10^4 L./ml Milch / Röhrchen mit 20 mm Ø (test tube)

Die Kontroverse um die Pasteurisierung als Methode zur Abtötung von in der Rohmilch evtl. vorkommenden Listerien entstand erneut, als es 1983 in Massachusetts zu einem Listerioseausbruch kam, bei dem epidemiologisch-methodisch (bakteriologisch wurden keine Listerien nachgewiesen) pasteurisierte Milch als Infektionsquelle ermittelt und Fehler in der Pasteurisierung sowie eine nachträgliche Kontamination mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden konnten (FLEMING et al., 1985; ANONYM, 1986a).

BRADSHAW et al. (1985), die im Pasteurisierungsprozeß eine sichere Abtötung der Listerien sahen, erhitzten Portionen von Vollmilch, die 1×10^5 Keime/ml enthielten, auf verschiedene Temperaturen von 52,2°C bis 74,4°C und errechneten hierbei entsprechende D-Werte von 28 min bis 0,7 s.

Der $D_{71,7^{\circ}\text{C}}$ -Wert lag bei 0,9 s.

In späteren Untersuchungen (BRADSHAW et al., 1987) mit "heavy cream" und "ice cream mix" wurden ähnliche Ergebnisse erzielt.

DONNELLY und BRIGGS (1986) stellten fest, daß auch die Milchezusammensetzung (Milch mit 11 % fettfreier Trockensubstanz, Magermilch, Vollmilch) und eine eventuelle vorherige Bebrütung bei verschiedenen Temperaturen keinen Einfluß auf die Inaktivierung der Listerien durch die Pasteurisierung hatten. Der von ihnen ermittelte $D_{62,7^{\circ}\text{C}}$ -Wert lag bei 1,0 min und darunter.

TERPLAN et al. (1986) konnten mit ihren Hitzeresistenzversuchen an einer Kurzzeiterhitzungseinrichtung eine ausreichende Abtötung von Listerien durch die Pasteurisierung ebenso bestätigen wie FARBER et al. (1987) mit ihren Untersuchungen zur Hitzetoleranz von *L. monocytogenes* in künstlich infizierter und natürlich kontaminierter Rohmilch.

Als unzulänglich sahen die Pasteurisierung DOMINGUEZ et al. (1985) an. Ihre Versuche ergaben, daß Listerien den Pasteurisierungstemperaturen widerstehen können.

Auch FERNANDEZ-GARAYZABAL et al. (1986) halten die Pasteurisierung zur Inaktivierung von *L. monocytogenes* für nicht ausreichend, nachdem sie pathogene *L. monocytogenes*-Stämme aus Milch, die dem "high-temperature, short-time"-Verfahren (HTST / 78°C für 15 s) unterzogen worden war, isolieren konnten und sich auch hier keine Anzeichen für fehlerhafte Pasteurisierung oder nachträgliche Kontamination ergaben.

Vergleichende Untersuchungen von DONNELLY et al. (1987) und BECKERS et al. (1987) zur Methodik der Hitzeresistenzversuche zeigten, daß eine mit der Röhrchenmethode imitierte

Pasteurisierung, wie von BEARNS und GIRARD (1958) durchgeführt, systembedingt nicht zur volligen Inaktivierung von *L. monocytogenes* führt. Die Methode sei daher ungeeignet und die damit erhaltenen Ergebnisse konnten nicht anerkannt werden. Dagegen lieferte die Hitzeinaktivierung in verschlossenen Reaktionsgefäßen, in Anlehnung an BRADSHAW et al. (1985), das eindeutige Ergebnis, daß frei in der Milch verteilte *L. monocytogenes* durch die Pasteurisierung sicher abgetötet werden.

Der Frage, ob Listerien, die intrazellulär in Leukozyten vorliegen, eine erhöhte Hitzeresistenz aufweisen, wie bei dem Ausbruch 1983 in Massachusetts in Betracht gezogen wurde, gingen in den letzten zwei Jahren mehrere Autoren nach.

BUNNING et al. (1986) benützten Mäuseperitonealphagozyten zur Ummantelung von *L. monocytogenes*. Sie stellten bei phagozytierten Listerien ($1,2 \times 10^4$ bis $9,0 \times 10^5$ /ml) einen $D_{71,7^\circ\text{C}}$ -Wert von 1,9 s fest gegenüber 1,6 s bei frei suspendierten Listerien ($6,9 \times 10^3$ bis $6,0 \times 10^5$ /ml). Die intrazelluläre Lage schützte *L. monocytogenes* nicht vor dem Hitzetod durch die üblichen Pasteurisierungsverfahren.

Zu anderen Ergebnissen kamen DOYLE et al. (1987). Sie setzten in ihren Versuchen zellreiche Milch (10^5 - 10^6 Zellen/ml), deren polymorphkernige Leukozyten jeweils - bis auf eine Ausnahme - durchschnittlich 1,5 bis 9,2 *L. monocytogenes*-Keime enthielten, bei insgesamt $1,4 \times 10^3$ bis $4,8 \times 10^4$ phagozytierten Listerien/ml Milch, der HTST-Pasteurisierung aus. Bei $71,7^\circ\text{C}$ bis $73,9^\circ\text{C}$ konnten sie noch nach 16,4 s lebende *L. monocytogenes* finden; erst eine Hitzeeinwirkung von $76,4^\circ\text{C}$ bis $77,8^\circ\text{C}$ für 15,4 s zerstörte alle Listerien. Die HTST-Pasteurisierung ($71,7^\circ\text{C}$; 15 s) hätte also zur Inaktivierung von *L. monocytogenes* nicht ausgereicht. Als weiteres zeigte sich, daß die Zahl der

intrazellulär lokalisierten Listerien bei einer Temperatur von 4°C innerhalb drei Tagen rapide abnahm und die Leukozyten am vierten Tage dem Zerfall anheim fielen. Die Autoren mutmaßten, daß sich Listerien, die sich in den polymorphkernigen Leukozyten vermehrten, eventuell hitzestabiler verhielten als solche, die nur von Makrophagen phagozytiert wurden. Ein Schutz vor dem Überleben von Listerien in kontaminierter Milch wäre ihrer Meinung demnach die Kuhlagerung der Milch vor der Pasteurisierung für die Dauer von einigen Tagen.

Dem konnten sich BUNNING et al. (1988) nicht anschließen. Sie untersuchten die Hitzeresistenz von sowohl phagozytierten als auch frei in der Milch suspendierten *L. monocytogenes*-Keimen (jeweils 10^6 Keime/ml) bei verschiedenen Temperaturen zwischen 57,8°C und 74,4°C zum einen mit der "sealed tube"- und zum anderen mit der "slug flow heat exchanger"-Methode. Dabei stellten sie bei phagozytierten Listerien ($26,1 \pm 19,3$ Keime pro Zelle bei einer Infektionsrate von 43 % der 10^4 pro ml Milch vorliegenden Phagozyten) einen $D_{71,7^\circ\text{C}}$ -Wert von 4,1 s fest gegenüber 2,7 s bei frei suspendierten Listerien. Der $D_{62,8^\circ\text{C}}$ -Wert für phagozytierte Listerien lag bei 53,8 s. Das Fazit der Autoren lautete, daß die intrazelluläre Lage von Listerien keine signifikante Erhöhung der Hitzeresistenz mit sich bringt. Langzeitpasteurisierung (62,8°C für 30 min) und HTST-Pasteurisierung (71,7°C für 15 s) reichten normalerweise aus, um phagozytierte und in der Milch frei suspendierte Listerien zu inaktivieren.

Tabelle 14: Zusammenfassende Darstellung der Hitze-
resistenzversuche neueren Datums (ab 1985)

Autor	Tempe- ratur (°C)	Einwir- kungszeit	D- Wert	Keimver- halten	Erhitzungsmedium / Methode
BRADSHAW et al, (1985)	52,2-74		28 min-0,7 s		beimpfte Milch mit 1×10^6 L./ml / verschlossene Borosilikatglas- röhrchen mit 13 mm Ø ("sealed tube") u. slug flow heat exchanger
	71,7		0,9 s		
DOMINGUEZ et al, (1985)				überlebt	beimpfte Milch mit ca. 10^6 L./ml / praxisübliche Pasteurisierung
BUNNING et al, (1986)	71,7		1,9 s		Milch mit 10^4 - 10^6 phagozyt. L./ml / "sealed tube"-Methode
	71,7		1,6 s		10^3 - 10^6 frei suspend. L./ml Milch / "sealed tube"-Methode u. slug flow heat exchanger
DONNELLY u. BRIGGS (1986)	62,7		1 min		"11 % nonfat milk solids", Ma- ger- bzw. Vollmilch mit 10^6 L./ml / verschlossene 2ml-Glasampullen
TERPLAN et al, (1986)	63	30 s		abgetötet	pasteur. Vollmilch mit 10^6 L./ml / Kurzzeitplattenerhitzer
BECKERS et al, (1987)	65	30 min		überlebt	Tryptose broth mit 10^3 - 10^6 L./ml / offene Röhrchen ("test-tube")
	70	15 min		überlebt	
	80	1 min		überlebt	
	67	20 s		abgetötet	Tryptose broth mit 10^3 - 10^6 L./ml
	70	10 s		abgetötet	/ verschlossene, 5x5 cm große Plastikbeutel (= sealed tube)
BRADSHAW et al, (1987)	79,4		0,5 s		"heavy cream" bzw. "ice cream mix" mit 10^6 L./g / "sealed tube"-Methode

Fortsetzung Tabelle 14:

Autor	Temperatur (°C)	Einwirkungszeit	D-Wert	Keimverhalten	Erhitzungsmedium / Methode
DONNELLY et al. (1987)	62	30 min		überlebt	Vollmilch bzw. "11 % nonfat milk solids" mit 10^6 - 10^7 L./ml / "test tube"-Methode
	72	30 min		überlebt	
	82	30 min		überlebt	
	62	0,1-0,4 min			Vollmilch bzw. "11 % nonfat milk solids" mit 10^6 - 10^7 L./ml / verschlossene 2ml-Glasampullen (= sealed tube)
DOYLE et al. (1987)	71,7-73,9	16,4 s		überlebt	Milch mit 10^3 - 10^6 phagozyt. L./ml / HTST-plate heat exchanger
	76,4-77,8	15,4 s		abgetötet	
FARBER et al. (1987)	> 67,5	16 s		abgetötet	Vollmilch mit 10^4 L./ml (bzw. natürlich kontamin. Sammelmilch) / Plattenerhitzer
BUNNING et al. (1988)	62,8		53,8 s		Milch mit 10^6 phagozyt. L./ml / "sealed tube"-Methode u. slug flow heat exchanger
	71,7		4,1 s		
	71,7		2,7 s		Milch mit 10^6 frei suspend. L./ml / "sealed tube"-Methode u. slug flow heat exchanger

2.3 Listerien in Fleisch und Fleischwaren

Bei der Bearbeitung der Problematik des Vorkommens von Listerien in Fleisch und Fleischwaren erhebt sich die Frage, inwieweit bereits gesunde Schlachttiere Listerien beherbergen bzw. die Tierkörper während der Schlachtung mit diesem Erreger kontaminiert werden. Zur Literatur hierzu sei auf die Arbeit von ERTEL (1988) verwiesen.

2.3.1 Vorkommen

Einige Autoren nehmen an, daß Fleisch und Fleischwaren bei der Entstehung von menschlichen Listeriosen beteiligt sein können (KAMPELMACHER, 1958; SEELIGER, 1961; GRAY, 1963; SKOVGAARD, 1986). PRENTICE und NEAVES (1986) messen zudem den intensiveren Hygienemaßnahmen bei der Produktherstellung Bedeutung bei, weil dadurch die Zahl der Schmutzkeime verringert würde und es für die Listerien leichter sei, sich durchzusetzen und sich, insbesondere bei Kühlschranktemperaturen, zu vermehren.

Es wurden auch bereits Fälle beschrieben, wo es nach der Handhabung oder dem Genuß von möglicherweise mit *L. monocytogenes* kontaminiertem Fleisch zu Listerioseerkrankungen bei Menschen gekommen sein soll. So berichtete KUZMINSKIJ (1956) von einem Listerioseausbruch bei 29 Personen, die in einer Gaststätte kontaminiertes Fleisch gegessen hatten. Die Fleischwaren waren vor Mäusen nicht ausreichend gesichert gewesen und vermutlich durch diese Tiere mit Listerien verseucht worden. Organabstriche von 70 Mäusen erwiesen sich als listerienpositiv.

Auch TEMPER (1961) berichtet, daß er selbst erlebt habe, wie ein Mann durch den Genuß von ca. 100 g infiziertem rohem Schabefleisch innerhalb weniger Stunden an einer

tödlichen *Listeria-Meningo-Encephalitis* erkrankte, wobei allerdings der Zusammenhang zwischen dem Verzehr des Fleisches und der Erkrankung nur auf epidemiologischen Rückschlüssen beruht.

ORTEL (1975a) fand *Listerien* in der Faeces von einem Nährbodenkoch und dessen Gehilfen. Er vermutete, daß die Aufnahme von *L. monocytogenes* bei der Verarbeitung von Freibankfleisch, das zur Nährbouillonherstellung diente, erfolgte.

Über die Untersuchung von Fleisch und Fleischwaren liegen nur wenige Angaben vor.

BREER (1986c) überprüfte 39 Hackfleischproben, wobei er in keiner *Listerien* nachweisen konnte.

Nach pathogenen Keimen, darunter *L. monocytogenes*, forschten TERNSTRÖM und MOLIN (1987) in 135 rohen Fleischproben, die zu gleichen Teilen vom Schwein, Rind und Hähnchen stammten; *L. monocytogenes*-Isolierungen gelangen ihnen nicht.

Fündig dagegen wurden ELISCHEROVA et al. (1979). Sie untersuchten im Laufe eines Jahres das in einem Haushalt zum Verzehr bestimmte Fleisch - 63 Proben vom Rind und 35 Proben vom Schwein. Bei den ersteren waren zwölf Proben *L. monocytogenes*-haltig, bei den letzteren sechs.

Auch LE GUILLOU (1980) fand in 6,8 % bei rohen Fleischwaren und in 8 % bei Hackfleisch *Listerien*. In Fleisch, das direkt am Schlachthof entnommen worden war, ließen sich keine *Listerien* nachweisen.

Umfangreichere Untersuchungen unternahmen NICOLAS und VIDAUD (1985). Von 306 Proben, und zwar 149 gefrorene Rinderhacksteaks, 37 Fleischprodukte, die für den Rohverzehr bestimmt waren und 120 rohe, zum Verzehr in gekochtem oder gebratenem Zustand bestimmte Fleischprodukte, waren 102 *listerien*haltig; bei 52 Isolaten handelte es sich um *L.*

monocytogenes, und zwar enthielten die 61 Listeria-positiven Rinderhacksteakproben 39mal, die zwölf Listeria-positiven Produkte zum Rohverzehr achtmal und die 29 Listeria-positiven rohen Produkte, die erst nach dem Erhitzen verzehrt werden, zwölfmal *L. monocytogenes*. Die Autoren vertraten die Auffassung, daß die Kontamination von Fleisch durch den Kontakt mit Innereien erfolgen müsse und die Weiterverarbeitung des Fleisches eine Verbreitung der Keime erlaube. Sie stützten ihre Ansicht auf die Tatsache, daß LE GUILLOU (1980) und COTTIN et al. (1985) im Schlachtfleisch selbst keine Listerien gefunden hatten, COTTIN et al. (1985) aber aus Lunge und Milz in 3,1 % von 487 gesunden Schlachttieren *L. monocytogenes* isolieren konnten.

Erwähnt seien schließlich noch Hinweise von GLEDEL (1986), daß in seinem Institut gegenwärtig Hackfleischproben vom Pferd auf die Anwesenheit von Listerien untersucht werden würden. Einige positive Ergebnisse (vorerst nur *L. innocua*) lägen bereits vor.

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse von verschiedenen Untersuchern über den Nachweis von *L. monocytogenes* in Fleisch und Fleischwaren gibt Tab. 15 wieder.

Tabelle 15: Vorkommen von *L. monocytogenes* in
Fleisch und Fleischwaren

Probenmaterial	Anzahl untersuch- ter Proben	<i>L. mono- cytogenes</i> - positiv	Autor
Rindfleisch	63	12	ELISCHEROVA et al, (1979)
Schweinefleisch	35	6	ELISCHEROVA et al, (1979)
rohe Fleischwaren	?	? (6,8 %)	LE GUILLOU (1980)
Hackfleisch	?	? (8,0 %)	LE GUILLOU (1980)
Rinderhacksteak, gefroren	149	39	NICOLAS und VIDAUD (1985)
Fleischprodukte, Verzehr im Rohzustand	37	8	NICOLAS und VIDAUD (1985)
rohe Fleischprodukte, Verzehr nach Erhitzung	120	12	NICOLAS und VIDAUD (1985)
Hackfleisch	39	0	BREER (1986c)
rohes Fleisch	135	0	TERNSTRÖM und MOLIN (1987)

2.3.2 Verhalten

Der Frage, ob Listerien in Fleisch die Weiterverarbeitung zu Fleischwaren unbeschadet überstehen können, ging FARCHMIN (1963) nach. Er kontaminierte Fleisch künstlich mit *L. monocytogenes*-Keimen und stellte aus einem Teil davon nach den gebräuchlichen Verfahren Kochwurst (Leberwurst), Brühwurst (Jagdwurst) und Rohwurst (Mettwurst) her. Dabei konnte er sowohl aus den 250 Proben Kochwurst als auch aus den 215 Proben Brühwurst keine Listerien mehr isolieren. Die 225 Proben Rohwurst, die lediglich kaltgeräuchert wurden, enthielten dagegen in 173 Fällen *L. monocytogenes*.

Der andere Teil des Fleisches wurde zur Herstellung von Kaßler, Schweinekopf, Spitzbeinen, Lachsschinken, Blatt- und Rollschinken gepökelt; die Kaßler wurden zudem noch heißgeräuchert. Alle 185 Kaßlerproben waren *L. monocytogenes*-frei. In den 545 Proben der anderen Produkte konnten in durchschnittlich über 63 % der Fälle *L. monocytogenes*-Keime nachgewiesen werden. Der Autor folgerte daraus, daß nur Erhitzung, nicht aber Pökellung zur Inaktivierung von Listerien führt.

Auch RUDELDT (1960) und SIELAFF (1966) sahen in der Anwendung von Hitze eine Möglichkeit zur Brauchbarmachung listerieninfizierten Fleisches, nicht dagegen im Gefrieren oder in der Pökellung.

SIELAFF (1966) stellte außerdem fest, daß die Reifung des Fleisches sowie der Rohwurst keinen Einfluß auf das Wachstum der Listerien ausübten, da Listerien in allen Reifungsphasen nachgewiesen werden konnten.

KHAN et al. (1973) untersuchten das Wachstum von *L. monocytogenes* in sterilem Lammfleisch in Abhängigkeit von der

Lagertemperatur und dem Verpackungsmaterial. Bei 0°C zeigten die Listerienzahlen bis zu zwei bis drei Wochen eine absteigende Tendenz, bei 8°C war ein derartiges Absinken nicht zu verzeichnen - es kam sofort zum Wachstum. Die Verpackung in gasundurchlässigen Beuteln hatte eher einen nachteiligen Effekt gegenüber gasdurchlässiger Verpackung. Aus Hackfleisch und Würstfleisch konnte der Keim bei einer anfänglichen Zahl von 10^4 Zellen/g bei 8°C-Lagerung 15 Tage lang und bei 4°C 21 Tage lang isoliert werden. In einer Aufschwemmung von reinem Muskelprotein starben die in einer Größenordnung von $1,5 \times 10^4$ pro ml zugesetzten Listerien sowohl bei 4°C als auch bei 8°C innerhalb 15 bis 25 Tagen ab, wenn das Eiweiß vom Schwein stammte, handelte es sich dagegen um Eiweiß vom Lamm, so vermehrten sie sich nach einer anfänglichen Abwartstendenz. Die Autoren brachten dieses Wachstumsverhalten der Listerien mit der unterschiedlichen Empfänglichkeit von Schwein und Schaf für Listeriosen in Zusammenhang und führten dies auf eine zum Teil andere Aminosäurezusammensetzung des Fleisches beider Tierarten zurück.

In weiteren Untersuchungen von KHAN et al. (1975) überlebten Listerien in Lammfleisch bei 0°C für 24 Tage in Höhe der Initialzahl (10^4 Zellen/g), während sie in Hackfleisch bei 0°C nur 20 Tage lang nachweisbar waren. Die in eine Aufschwemmung von reinem Muskeleiweiß - jeweils vom Lamm, Rind oder Schwein stammend - eingebrachte Listerienmenge (10^4 Zellen/ml) blieb beim Lamm über zwölf Tage konstant, nahm beim Rind nach anfänglicher Verzögerung leicht zu und stieg beim Schwein - im Gegensatz zu früheren Versuchen - sogar auf 10^7 Zellen/ml an.

GOUET et al. (1978) überprüften das Verhalten von *L. monocytogenes* im Rinderhackfleisch bei einer Lagerung von 8°C bei Zusatz verschiedener Begleitkeime. War *L. monocytogenes* allein im Fleisch vorhanden, erfolgte keine Vermehrung; lag

L. monocytogenes zusammen mit *Lactobacillus plantarum* vor, so verminderte sich die Zahl der vorhandenen Listerien. Bei Anwesenheit einer reichhaltigeren Mischflora, besonders wenn *Pseudomonas fluorescens* zugegen war, kam es dagegen, nach einem anfänglichen kurzem Abwärtstrend, zu einer starken Zunahme von *L. monocytogenes*. Besonders *Pseudomonas fluorescens* schien die Vermehrung der Listerien positiv zu beeinflussen, zumal diese Keime durch den proteolytischen Abbau von Fleisch den pH-Wert ansteigen ließen.

1986 untersuchten JOHNSON et al. (1986) das Verhalten von *L. monocytogenes* in Hackfleisch bei 4°C über eine Periode von zwei Wochen. Die *L. monocytogenes*-Zahl blieb während der ganzen Zeit konstant. Die Art der Verpackung, ob gasdurchlässig oder nicht, war dabei ohne Einfluß.

Letztlich überprüften JOHNSON et al. (1988) das Verhalten von *L. monocytogenes* während Herstellung, Reifung und anschließender Lagerung von Salami. Hierzu verwendeten sie zum einen Fleisch, das von einer experimentell infizierten Kuh stammte und 10^9 CFU/g enthielt, zum anderen genußtaugliches Rindfleisch, dem die gleiche Keimmenge vor Versuchsbeginn zugesetzt wurde. Die Herstellung der Salami erfolgte nach einem gewerbeüblichen Verfahren. Während der Reifung (pH-Abnahme von 5,5 auf 4,5) nahm die Listerienzahl zunächst um eine Zehnerpotenz ab und sank dann während der Trocknung und anschließenden Lagerung bei 4°C auf 20 CFU/g (zwölf Wochen nach der Herstellung). Die Art des Fleisches blieb dabei ohne Einfluß. Es konnte gezeigt werden, daß sich Listerien bei der Salami-Herstellung zwar nicht vermehrten, daß sie aber überleben können, wenn ihre initiale Zahl 10^9 CFU/g und mehr beträgt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle Autoren einhellig der Meinung waren, daß Überleben oder Wachstum von *L. monocytogenes* im Fleisch und die Weiterverbreitung dieser

Keime auf die entsprechenden Fleischprodukte möglich ist.

3. Eigene Untersuchungen

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, abzuklären:

- a) ob und in welchem Umfang in der Bundesrepublik Deutschland hergestellter Käse mit Listerien kontaminiert ist,
- b) ob die zur Herstellung von listerienhaltigem Käse verwendete Milch pasteurisiert worden war,
- c) inwieweit auch Fleisch und Fleischwaren des Handels Listerien enthalten.

3.1 Material

3.1.1 Untersuchungsmaterial

- a.) Zur Untersuchung kamen von November 1986 bis April 1987 200 Proben verschiedener in der Bundesrepublik Deutschland hergestellter Käsesorten:

- 59 Weichkäse mit Schmiere
- 86 Weichkäse mit Schimmel
- 2 Weichkäse ohne Flora
- 24 Sauermilchkäse mit Schmiere
- 6 Sauermilchkäse mit Schimmel
- 7 halbfeste Schnittkäse mit Schmiere
- 4 halbfeste Schnittkäse mit Schimmel
- 6 halbfeste Schnittkäse ohne Flora
- 6 Schnittkäse mit Schmiere

53 Proben davon stammten aus Einsendungen von Milch-industriebetrieben an den Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Universität München, die restlichen 147 Proben wurden in 27 Geschäften im Regierungsbezirk Schwaben und in München gekauft. Hierbei wurde darauf geachtet, daß keine Käsesorte

eines Herstellers doppelt erworben wurde.

a₂) Zur Nachuntersuchung kamen im April 1987 18 Käseproben:

- 9 Weichkäse mit Schmiere
- 8 Sauermilchkäse mit Schmiere
- 1 Sauermilchkäse mit Schimmel

b) In 11 dieser nachuntersuchten Proben, bestehend aus
4 Weichkäsen mit Schmiere und
7 Sauermilchkäsen mit Schmiere,
wurde überprüft, ob pasteurisierte oder ungenügend er-
hitzte Milch zur Herstellung verwendet wurde.
Als Kontrollen wurden der Untersuchung zusätzlich
1 Weichkäse mit Schimmel, aus wärmebehandelter
Milch hergestellt, und
1 Weichkäse mit Schimmel, aus Rohmilch hergestellt,
unterzogen.

c) Die 200 Fleisch- und Wurstproben, die im ersten
Quartal 1987 zur Untersuchung gelangten, setzten
sich aus
50 Hackfleisch-,
50 Tatar-,
50 Mettwurst- und
50 Schinkenplockwurstproben
zusammen und stammten aus 32 bzw. 55 Metzgereien,
Filialen und Kaufhäusern aus dem Regierungsbezirk
Schwaben bzw. aus München. Die Tatarproben und
Schinkenplockwurstproben wurden in 50 verschiedenen,
die Hackfleischproben in 41 und die Mettwurstproben in
42 Geschäften gekauft. Bei den beiden letztgenannten
Produkten wurde in neun bzw. in acht Geschäften nach
einer Woche jeweils eine zweite Probe gekauft.

3.1.2 Zur Listeriendiagnostik verwendete Nährmedien und Reagenzien

- Anreicherungsbouillon (EB):

Basisnährboden:

Trypticase Soja Bouillon (BBL, 11768) mit

0,6 % Hefezusatz (Merck, 3753)

supplementiert mit:

Acriflavin (Sigma, A-8251) 15 mg/l

Nalidixinsäure (Sigma, N-4382) 40 mg/l

Cycloheximid (Sigma, C-6255) 50 mg/l

- 0,5%ige KOH-Lösung (Merck, 5033)

- Modifizierter McBride-Agar:

Basisnährboden:

Phenylethanol Agar (Difco, 0504-01-0) mit

1 % Glycin- (Sigma, G-7251) und

0,05 % Lithiumchloridzusatz (Sigma, L-0505)

supplementiert mit:

Cycloheximid (Sigma, C-6255) 200 mg/l

- Tryptone Soya Agar mit Yeast Extract (TSA-YE-Agar):

Tryptone Soya Agar (Oxoid, CM 131) mit

0,6 % Hefezusatz (Merck, 3753)

- Trypticase Soja Bouillon mit Yeast Extract (TSB-YE):

Trypticase Soja Bouillon (BBL, 11768) mit

0,6 % Hefezusatz (Merck, 3753)

- 3%ige H₂O₂-Lösung (Merck, 8600)

- 3%ige KOH-Lösung (Merck, 5033)

- Tryptone Soya Agar mit Yeast Extract und Blutzusatz
(TSA-YE-Blutagar):

Basisnährboden:

Tryptone Soya Agar (Oxoid, CM 131) mit
0,6 % Hefezusatz (Merck, 3753)

zufügen von:

defibriniertem, sterilem Schafblut 70 ml/l

- Harnstoff-Agar:

Basisnährboden:

Harnstoff-Agar nach CHRISTENSEN (Merck, 8492)

zufügen von:

40%iger Harnstofflösung (Merck, 8487) 50 ml/l

- Sulfide Indole Motility Test Medium mit Yeast Extract
(SIM-YE):

SIM-Nährboden (Oxoid, CM 435) mit
0,6 % Hefezusatz (Merck, 3753)

- Nitrat-Bouillon (Merck, 10204)

- Griess-Ilosvays-Reagenz (Merck, 9023)

- Zinkstaub (Merck, 8774)

- Methylrot-Voges Proskauer-Bouillon (MR-VP-Bouillon):

MR-VP-Bouillon (Merck, 5712)

- Methylrotlösung:

Methylrot (Merck, 6076)	0,1 g
Ethanol, 95%ig (Merck, 983)	300 ml
Aqua dest.	ad 500 ml

- α -Naphthollösung:

Naphthol-(1) (Merck, 6233)	5 g
Ethanol abs. (Merck, 983)	100 ml

- 40%ige KOH-Lösung (Merck, 5033)

- Triple Sugar Iron Agar (TSI):

Eisen-Dreizucker-Agar (Merck, 3915)

- Zuckerlösungen:

Basisnährboden:

Purple Broth Base (Difco, 0227-01-6)

zufügen des jeweiligen Kohlenhydrats:

Glucose (Merck, 8342)	0,5 %
Askulin (Merck, 842)	0,5 %
Maltose (Merck, 5910)	0,5 %
Mannit (Merck, 5987)	0,5 %
Rhamnose (Sigma, R-3875)	0,5 %
Xylose (Sigma, X-1500)	0,5 %

- Tryptone Soya Agar (TSA):

Tryptone Soya Agar (Oxoid, CM 131)

3.1.3 Zur Bestimmung der Phosphataseaktivität im Käse verwendete Chemikalien und Gerätschaften

Die entsprechenden Angaben sind aus der Methodensammlung der A.O.A.C. (13. Ausgabe, 1980) unter 16.275 Residual Phosphatase (27), Official Final Action auf den Seiten 269 bis 272 und unter 16.116 Residual Phosphatase, Method II (27), Official Final Action auf den Seiten 252 und 253 zu entnehmen.

3.2 Methodik

3.2.1 Listeriennachweis im Käse

3.2.1.1 Isolierung

Die Isolierung von Listerien aus den Kaseproben erfolgte in Anlehnung an die Methode der FDA und ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

25 g des zu untersuchenden Materials wurden mit 225 ml Anreicherungsbouillon in einem Stomacher (Colworth, Stomacher 400) gründlich durchmischt und anschließend 1 ml und 10 ml dieses Ansatzes nochmals im Verhältnis 1:10 mit Anreicherungsbouillon versetzt.

Nach 48stündiger Inkubation in einem Brutschrank (Memmert, B60) bei 30°C wurden alle drei Ansätze direkt und beim unverdünnten Ausgangsansatz zusätzlich unmittelbar nach Versetzen der Bouillon mit 0,5 %iger KOH-Lösung im Verhältnis 1:10 auf McBride-Agar ausgestrichen.

Nach einer 48stündigen Bebrütung der Platten bei 35°C erfolgte die Auswertung mit dem Beleuchtungsverfahren nach Henry (HENRY, 1933). Hierzu wurde ein Diaprojektor (Presenta, Autofocus 2000) verwendet, dessen Lichtstrahl in einem 45°-Winkel auf einen Spiegel traf, und von diesem auf die Bodenfläche der Nährbodenplatte reflektiert wurde.

Listerienverdächtige Kolonien, die an ihrer bläulichgrauen Farbe zu erkennen waren, wurden zur Reinigung auf TSA-YE-Agar überimpft. Die nach erneuter Bebrütung bei 35°C nach 24-48 h gewachsenen Kolonien wurden ebenfalls mit der Henry'schen Beleuchtungstechnik überprüft und dem nachstehend beschriebenen Differenzierungsverfahren unterworfen. Dabei wurden für die Schnelltests die verdächtigen Kulturen zum einen direkt von der TSA-YE-Agarplatte entnommen, für die weiterführenden Tests eine 24 h bei 35°C bebrütete Nährbouillon (TSB-YE) der entsprechenden Kulturen verwendet.

I. Schnelltests

a) Nativpräparat

Bei der Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop (Leitz, Dialux 20) wurden Morphologie und Beweglichkeit der Keime beurteilt.

b) Katalase-Test

Die verdächtigen Kolonien wurden hierzu mit einer Platinöse in einem Tropfen 3%iger H_2O_2 -Lösung verrieben. Sauerstofffreisetzung konnte an einer "Gasblasenbildung" erkannt werden.

c) Gram-Verhalten

Verdächtige Keime wurden durch Verreiben einer Kolonie mit einer Öse in einem Tropfen 3%iger KOH-Lösung überprüft. Viskositätsenerhöhung, sichtbar am Anhaften eines Schleimfadens beim Hochheben der Öse vom Objektträger, bedeutete negatives, das Ausbleiben dieser Veränderung dagegen positives Gram-Verhalten.

Ergaben die untersuchten Kulturen in den Schnelltests den Listerien entsprechende Reaktionen (Tab. 16), wurden sie weiteren Untersuchungen unterworfen.

II. Weiterführende Tests

a) Hämolyse-Test

Mit einer Impfnadel wurden Stichkulturen in den TSA-YE-Blutagar-Platten angelegt. Nach einer Bebrütung der Platten bei 35°C für 48 h wurde das Hämolysebildungsvermögen beurteilt. Proben mit β -Hämolyse wurden zunächst als presumptive *L. monocytogenes* erfaßt und weiteruntersucht.

b) Prüfung auf Harnstoffspaltung

Der entsprechende Schrägagar (siehe 3.1.2) wurde an seiner schrägen Oberfläche völlig mit den verdächtigen Kulturen beimpft und bei 35°C für 5 Tage bebrütet. Verfärbung des Agars ins Kirschrote bedeutete Harnstoffspaltung, das Verbleiben der gelben Farbe kennzeichnete das Ausbleiben der Hydrolyse.

c) Beweglichkeitsprüfung

In den halbfesten SIM-YE-Nährböden wurden Stichkulturen angelegt. Die Bebrütung erfolgte bei 30°C für 48 h und eventuell anschließend bei Zimmertemperatur für einige Tage. Beweglichkeit zeigte sich durch eine diffuse Trübung des Nährbodens in der Umgebung des Stichkanals mit einer typischen Schirmchenbildung ("Umbrella-Phänomen") knapp unterhalb der Agaroberfläche.

d) Nitrat-Reduktion

Nitrat-Bouillon wurde beimpft und 5 Tage lang bei 35°C bebrütet. Nach Zugabe von Griess-Ilosvays-Reagenz wurde auf eine mögliche Rotfärbung als Zeichen des Nitratabbaues geachtet. Die Gegenprobe bei negativem Ausfall wurde mit nitratreduzierendem Zinkstaub durchgeführt.

e) Methylrot-Voges Proskauer-Reaktion (MR-VP)

Für beide Reaktionen wurden je ein Röhrchen mit MR-VP-Bouillon beimpft und für 4 Tage bei 35°C inkubiert. Dem einen Röhrchen wurden einige Tropfen Methylrotlösung zugegeben. Das Entstehen einer roten Farbe zeigte eine positive MR-Reaktion an. Im anderen Röhrchen entstand nach Zugabe von α -Naphthol-Lösung und 40%iger wässriger KOH-Lösung bei positivem VP-Reaktionsausfall eine rote Farbe.

f) TSI

Die zu untersuchende Kultur wurde sowohl auf die Schrägfläche als auch durch zentralen Stich in die Hochschicht des Eisen-Dreizucker-Agars verimpft und bei 35°C bis zu 5 Tage bebrütet. Ein Farbumschlag nach gelb sowohl in der Hochschicht als auch auf der Schrägfläche bedeutete Säuerung; eine Schwärzung zeigte H₂S-Bildung an.

g) Zuckerfermentation

Die jeweiligen Zuckerröhrchen (siehe 3.1.2) wurden mit den verdächtigen Kulturen beimpft und für 7 Tage bei 35°C aufbewahrt. Ein Farbumschlag nach gelb trat bei Säuerung auf. Gasbildung wurde mit Hilfe von Durham-Röhrchen beurteilt.

III. Serologische Differenzierung

Kulturen, die in den vorausgegangenen Tests als Listerien bestätigt werden konnten, wurden zur serologischen Differenzierung an das Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (Prof. Dr. H.P.R. Seeliger) geschickt. Der Transport erfolgte auf in Röhrchen abgefülltem TSA-Schrägagar, der zugleich auch als Aufbewahrungsmedium für Reinkulturen diente.

Ein zusammenfassendes Schema der angewandten Isolierungsmethode gibt Abb. 1.

Eigenschaften der Isolate, die für eine Zuordnung zur Gattung *Listeria* maßgebend sind, werden zusammenfassend in Tab. 16 wiedergegeben. Dabei sind diejenigen Tests, in denen sich alle *Listeria*-Spezies gleich verhalten, mit Plus- oder Minuszeichen dargestellt. Reaktionen, in denen die einzelnen *Listeria*-Spezies differieren und die deshalb zur Speziesdifferenzierung geeignet sind, sind mit zwei gegenläufigen Pfeilen gekennzeichnet. Sie sind in Tab. 3 unter 2.1.2 (Literaturteil) aufgelistet.

Tabelle 16: Reaktionsverhalten der Listerien in Anlehnung an SEELIGER und JONES (1986)

Beleuchtungsver- fahren nach Henry		Nativpräparat		Katalase-Test		Gram-Verhalten							
matte, bläulich- graue Kolonien		schlanke, kurze Stäb- chen; am Ort rotie- rende Bewegung		+		+							
Hämo- lyse	Harn- stoff- spalt,	Beweg- lich- keit	Nitrat- Reduk- tion	MR-VP		TSI		Zuckerfermentation					
				MR	VP	Säue- rung	H ₂ S- bildg.	Glucose	Äs- kulin	Mal- tose	Man- nose	Rham- nose	Xy- lose
±	-	+	±	+	+	+	-	+	+	+	±	±	±

±) Verhalten von jeweiliger *Listeria*-Spezies abhängig; Darstellung in Tab. 3 unter 2.1.2

3.2.1.2 Bestimmung der Listerienmenge

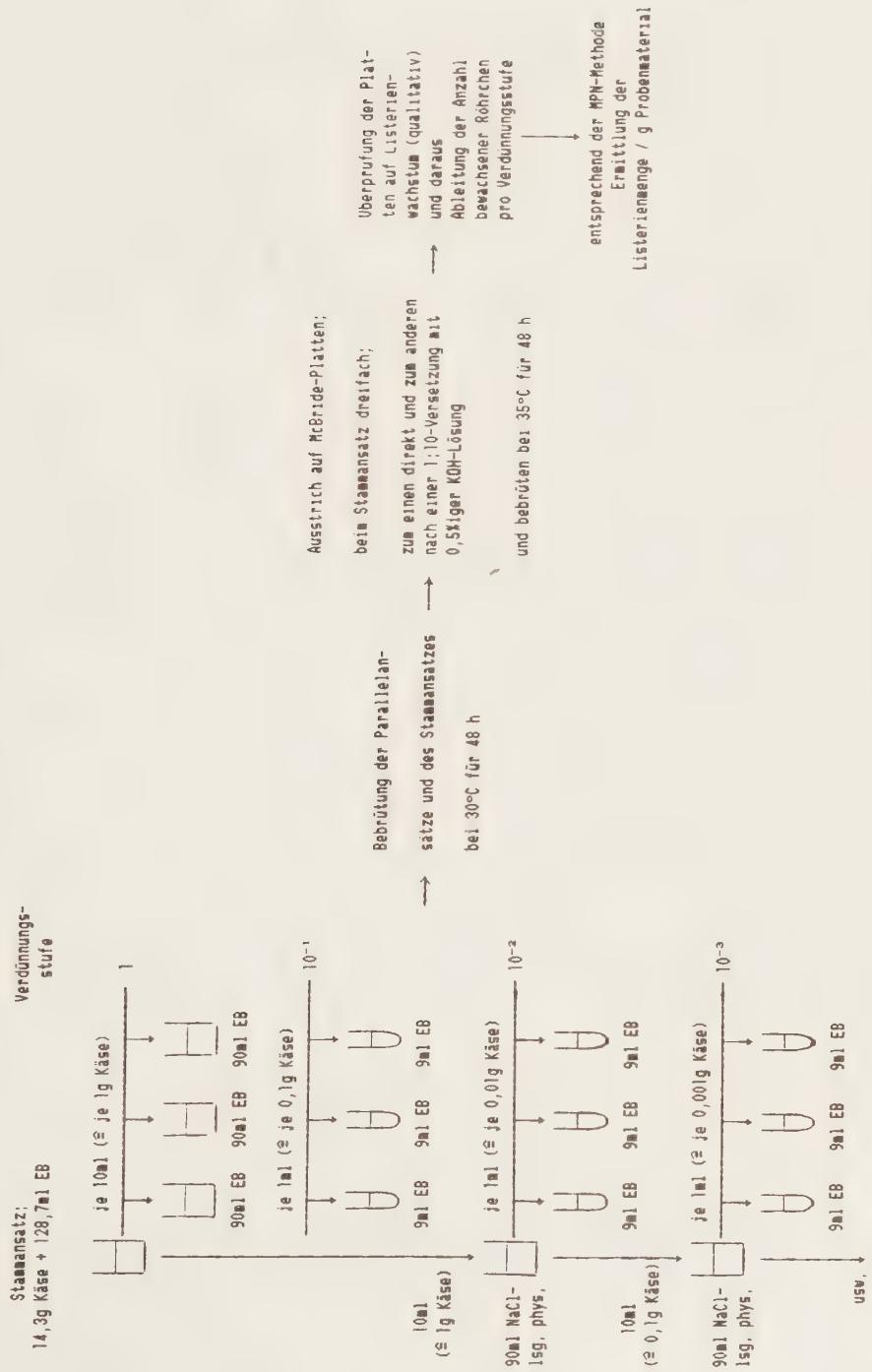
Die Bestimmung der Listerienmenge, die in allen nach 3.2.1.1 listerienhaltigen Kaseproben anhand der MPN-Methode durchgeführt wurde, erfolgte - bei einer zwischenzeitlichen Lagerung bei Kühlschranktemperaturen - spätestens zwei bis drei Wochen nach dem ersten Probenansatz:

14,3 g Käse und 128,7 ml Anreicherungsbouillon, gründlich gemischt, dienten als Stammansatz. Aus diesem wurden nun zum einen jeweils 10 ml ($\approx$ 1 g Käse) in drei Kolben mit je 90 ml Anreicherungsbouillon und zum anderen jeweils 1 ml ($\approx$ 0,1 g Käse) in drei Röhrchen mit je 9 ml Anreicherungsbouillon pipettiert. Zur Herstellung der weiteren Parallelansätze mit 0,01 g Käse, 0,001 g Käse usw. wurden 10 ml des Stammansatzes in Zehnerstufen mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und aus jeder Verdünnungsstufe jeweils 1 ml in drei Röhrchen mit je 9 ml Anreicherungsbouillon gegeben. Alle Ansätze und der Stammansatz, der nach der beschriebenen Prozedur letztlich noch 10 g Käse enthielt, wurden anschließend für 48 Stunden bei 30°C bebrütet.

Danach erfolgte die Beimpfung von McBride-Platten - beim Stammansatz dreifach, als Ersatz für die fehlenden Parallelansätze bei dieser Stufe - sowohl direkt als auch nach KOH-Behandlung.

Nach der 48stündigen Bebrütung bei 35°C wurden die Platten entsprechend den in 3.2.1.1 erwähnten Kriterien auf qualitatives Listerienwachstum überprüft, und bei der geeigneten Verdünnungsstufe gemäß den MPN-Bestimmungen eine Stichzahl erstellt. Mit der ermittelten Stichzahl konnte die höchstwahrscheinliche Listerienmenge der betreffenden Verdünnungsstufe aus der Tabelle nach McCrady (Vorlesungsskriptum "Seminar in der Milchwissenschaft mit Übungen", Teil II, WS 1984/85) abgelesen und pro g Käse umgerechnet werden.

Abbildung 21. Schematische Darstellung der Bestimmung der Listerienmenge nach der MPN Methode



3.2.1.3 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in Kaseproben

Die Durchführung erfolgte nach der in der Methodensammlung der A.O.A.C. (13. Ausgabe, 1980) unter 16.275 Residual Phosphatase (27) auf den Seiten 269 bis 272 und unter 16.116 Residual Phosphatase, Method 11 (27) auf den Seiten 252 und 253 beschriebenen Methode.

Es soll hier nur das für die Besprechung der Ergebnisse wichtige Funktionsprinzip erläutert werden.

Dem Milchprodukt wird als Substrat Dinatriumphenylphosphat zugesetzt, welches durch die eventuell im Milchprodukt vorhandene alkalische Phosphatase in Phenol und Dinatriumhydrogenphosphat gespalten wird.

In einer zweiten Reaktion wird das gebildete Phenol mittels des Reagenzes 2,6-Dibromochinon-1,4-chlorimid-4 zu Indophenol, einem blauen Farbstoff, umgesetzt und kann quantitativ mit Extinktionsmessungen erfaßt werden.

Das Milchprodukt kann zwei verschiedene Arten von alkalischer Phosphatase enthalten. Zum einen die Milchphosphatase, die in der Milchdrüse gebildet wird und somit in der Rohmilch vorhanden ist, zum anderen die mikrobielle Phosphatase, die von Kontaminationskeimen stammt bzw. von Mikroorganismen, die dem Produkt zur Herstellung zugesetzt worden sind.

Zur Überprüfung der Pasteurisierung ist lediglich die in der Rohmilch vorhandene Milchphosphatase von Bedeutung. Diese wird bei Hitzeeinwirkungen inaktiviert, die bei der rechtlich definierten Pasteurisierung angewandt werden.

Ihr Fehlen bzw. ihr Vorhandensein zeigt also an, ob eine ordnungsgemäße Pasteurisierung erfolgt ist oder nicht.

Die Differenzierung zwischen der alkalischen Milchphospha-

tase und der den Nachweis storenden alkalischen Phosphatase mikrobiellen Ursprungs beruht darauf, daß die Milchphosphatase durch fünfminütiges Erhitzen auf 70°C denaturiert und somit inaktiviert wird, während dies bei der mikrobiellen Phosphatase dagegen erst nach einer einminütigen Einwirkung von 90°C geschieht.

Genau abgemessene Mengen eines Produkts werden diesen Temperaturen ausgesetzt bzw. nicht erhitzt und anschließend den erwähnten chemischen Reaktionen unterworfen.

Durch den Vergleich der bei den verschiedenen Temperaturen erhaltenen Extinktionen erfolgt die Zuordnung zu der entsprechenden alkalischen Phosphatase.

Für die graphische Darstellung war es nötig, eine Phenol-Standard-Kurve zu erstellen. Hierzu wurden bekannte Phenolkonzentrationen entsprechend dem erwähnten zweiten Reaktionsschritt zu Indophenol umgesetzt und anschließend Extinktionsmessungen vorgenommen.

3.2.2 Listeriennachweis in zerkleinerten Fleisch- und Wurstproben

3.2.2.1 Isolierung

Die Untersuchung erfolgte möglichst noch am Einkaufstag der Proben, spätestens aber zwei Tage danach - bei zwischenzeitlicher Aufbewahrung im Kühlschrank - wie unter 3.2.1.1 für Käse beschrieben.

3.2.2.2 Bestimmung der Listerienmenge

Die Keimzählung wurde an allen listerienpositiven Schinkenplockwurstproben sowie an jeweils zehn der listerienhaltigen Hackfleisch-, Tatar- und Mettwurstproben (willkürlich ausgewählt) spätestens ein bis zwei Wochen nach Einkauf der Proben (Aufbewahrung im Kühlschrank), wie unter 3.2.1.2 beschrieben, durchgeführt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Listeriennachweis im Käse

3.3.1.1 Isolierung

Von den 200 untersuchten Käseproben enthielten 21 (10,5 %) Listerien, wobei es sich nur in einem Fall (0,5 %) um den pathogenen Keim *L. monocytogenes*, in den übrigen Fällen um die apathogenen *L. innocua* handelte. Betroffen waren insgesamt nur Weichkäse mit Schmiere (16,9 %), Sauermilchkäse mit Schmiere (37,5 %) und Sauermilchkäse mit Schimmel (33,3 %). Bei dem *L. monocytogenes* enthaltenden Käse handelte es sich um einen Sauermilchkäse mit Schmiere.

Tabelle 17: Vorkommen von Listerien im Käse

	Weichkäse - Oberfläche -			Sauermilchkäse - Oberfläche -		halbfester Schnittkäse - Oberfläche -			Schnitt- käse	Summe
	mit Schmiere	mit Schimmel	ohne Flora	mit Schmiere	mit Schimmel	mit Schmiere	mit Schimmel	ohne Flora	mit Schmiere	
Anzahl untersuch- ter Proben	59	86	2	24	6	7	4	6	6	200
(%)	(29,5)	(43,0)	(1,0)	(12,0)	(3,0)	(3,5)	(2,0)	(3,0)	(3,0)	(100)
davon										
Listerien- positiv	10 (16,9)	-	-	9 (37,5)	2 (33,3)	-	-	-	-	21 (10,5)
<i>L. mono- cytogenes</i>	-	-	-	1 (4,1)	-	-	-	-	-	1 (0,5)
<i>L. in- nocua</i>	10 (16,9)	-	-	8 (33,3)	2 (33,3)	-	-	-	-	20 (10,0)

Wie bereits erwähnt, wurden 147 der 200 Proben in Einzelhandelsgeschäften im Regierungsbezirk Schwaben bzw. in München gekauft. Alle 21 listerienpositiven Käse stammten aus diesen Einkäufen. In den direkt aus Käsereien eingesandten 53 Proben wurden keine Listerien nachgewiesen.

Eine Zuordnung der listerienpositiven Käse zu den auf der Verpackung angegebenen Hersteller- bzw. Vertriebsfirmen gibt Tab. 18 wieder. Hieraus ist zu entnehmen, daß bei zwölf von 64 Betrieben in Produkten Listerien enthalten waren. Aus dem Bereich der mit Säurewecker und Lab hergestellten Käse führt etwa jeder achte Betrieb in seiner Produktpalette listerienhaltige Produkte, bei den Sauermilchkäse herstellenden Firmen fast jede zweite.

Während bei acht Firmen jeweils nur ein Produkt von eins bis fünf untersuchten Produkten pro Firma mit Listerien kontaminiert war, waren bei einer Firma zwei von elf untersuchten, bei einer anderen drei von vier untersuchten und bei zwei weiteren Firmen je vier von fünf bzw. zehn untersuchten Produkten listerienhaltig.

In einer folgenden Versuchsreihe sollte jeweils eine weitere Probe der als positiv befundenen 21 Käsemarken - aus dem gleichen Geschäft wie die Erstprobe - einer Nachuntersuchung unterzogen werden.

Bei drei Käsesorten mußte auf die Nachuntersuchung verzichtet werden, da die entsprechenden Produkte im jeweiligen Geschäft nicht mehr erhältlich waren.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung und deren Vergleich mit denen der Erstuntersuchung sind in Tab. 19 dargestellt.

Nur elf der 18 vormals listerienpositiven Käse enthielten Listerien, wobei in neun Fällen bei der Nachuntersuchung die gleiche Listerienspezies wie bei der Erstuntersuchung gefunden wurde. In einem Fall war bei der Erstuntersuchung *L. monocytogenes*, bei der Nachuntersuchung *L. innocua*, im zweiten Fall war bei der Erstuntersuchung *L. innocua*; bei

der Nachuntersuchung eine L. monocytogenes-L. innocua-Mischkultur festgestellt worden.

Tabelle 18: Numerische Auflistung der Hersteller- bzw. Vertriebsfirmen mit listerienpositiven Proben

	Bereich mit Säurewecker und Lab hergestellter Käse	Bereich Sauermilchkäse	Summe
Anzahl der Hersteller- bzw. Vertriebsfirmen, von denen Produkte untersucht wurden	51	14	64*
Anzahl der Betriebe mit listerien- positiven Produkten	6	6	12
davon mit 4 listerien- positiven Produkten	1	1	2
davon mit 3 listerien- positiven Produkten	-	1	1
davon mit 2 listerien- positiven Produkten	1	-	1
davon mit 1 listerien- positiven Produkt	4	4	8

*) unter den Proben einer Vertriebsfirma befand sich sowohl mit Säurewecker und Lab hergestellter Käse als auch Sauermilchkäse

Tabelle 19: Nachuntersuchung von 18 bei der Erstuntersuchung listerienpositiven Käsemarken und Vergleich der Ergebnisse

Befund bei Erstunter- / Nachunter- suchung suchung	Weichkäse mit Schmiere	Sauermilchkäse mit Schmiere	Sauermilchkäse mit Schimmel
L. innocua / negativ	5	1	1
L. innocua / L. innocua	3	6	-
L. monocytogenes / L. innocua	-	1	-
L. innocua / L. monocytogenes- L. innocua- Mischkultur	1	-	-

Über die Effektivität drei verschiedener Anreicherungsvariationen hinsichtlich der Listerienisolierung aus den Käseproben gibt Tab. 20 Auskunft.

Betrachtet man die Erst- und Nachuntersuchung zusammen (32 Proben), so konnten in etwas über 56 % der Fälle (18 Proben) bei allen drei Ansätzen Listerien nachgewiesen werden. Durch Ansatz A (25 g Probe + 225 ml EB) wurden 26 der 32 listerienpositiven Proben (81,3 %) erfaßt, durch Ansatz B (1 ml von Ansatz A 1:10 mit EB verdünnt) 22 (68,8 %) und durch Ansatz C (10 ml von Ansatz A 1:10 mit EB verdünnt) 27 (84,4 %).

Tabelle 20: Effektivität von drei Anreicherungsvarianten

Ansatz A	Ansatz B	Ansatz C	Anzahl listerienpositiver Käseproben	
225 ml EB + 25 g Probe + Ausstrich direkt u. indirekt nach KOH-Be- handlung	1 ml von Ansatz A 1:10 mit EB verdünnt + Ausstrich direkt	10 ml von Ansatz A 1:10 mit EB verdünnt + Ausstrich direkt	Erstunter- suchung	Nachunter- suchung
+	+	+	11	7
+	+	-	0	0
+	-	+	3	2
+	-	-	2	1
-	+	+	2	0
-	+	-	2	0
-	-	+	1	1
			----	----
		Summe:	21	11

+) Isolierung erfolgt

-) keine Isolierung

3.3.1.2 Bestimmung der Listerienmenge

Die Ergebnisse der Keimgehaltsermittlung mit der MPN-Methode an 21 listerienpositiven Käsen der Erstuntersuchung sind in Tab. 21 zusammengefaßt.

Bei den zehn listerienpositiven Weichkäsen betrug die höchste Listerienmenge in einer Probe 15 Keime/g, bei sieben lag sie unter 1 Keim/g. Im Sauermilchkäse wurden in einer Probe 1,5 Listerien/g Käse nachgewiesen, in fünf Proben zwischen 10 und 100 Keime/g, in zwei Proben zwischen 10^2 und 10^3 Keime/g und in drei Proben zwischen 10^3 und 10^4 Keime/g. Bei der einzigen L. monocytogenes-haltigen Probe wurden 25 L. monocytogenes/g Käse nachgewiesen.

Tabelle 21: Höchstwahrscheinliche Listerienzahl pro Gramm
Käse in 21 listerienhaltigen Käseproben

Bereiche von Listerien- gehalten / g	Listerien / g in		
	Weichkäse mit Schmiere	Sauermilchkäse mit Schmiere	Sauermilchkäse mit Schimmel
< 1	< $0,3 \times 10^{-1}$		
	< $0,3 \times 10^{-1}$		
	< $0,3 \times 10^{-1}$		
	$0,7 \times 10^{-1}$		
	0,25		
	0,25		
	0,9		
1 - 10	9,5	1,5	
	9,5		
> 10 - 1×10^2	15,0	20,0	15,0
		20,0	
		25,0 *	
		95,0	
> 1×10^2 - 1×10^3		$2,5 \times 10^2$	
		$9,5 \times 10^2$	
> 1×10^3 - 1×10^4		$4,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$
		$9,5 \times 10^3$	

*) L. monocytogenes-haltiger Käse

3.3.1.3 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in Käseproben

Die für die Erstellung der Phenol-Standard-Kurve vorgenommenen photometrischen Messungen ergaben entsprechend den jeweils verwendeten Phenolkonzentrationen folgende Extinktionen (Tab. 22):

Tabelle 22: Extinktionswerte bei photometrischer Messung definierter Phenolkonzentrationen

Phenolkonzentration [µg/ml]	Extinktion
0,5	0,010
1	0,025
3	0,053
5	0,079
10	0,202
20	0,402
30	0,600
40	0,821

Aus den erhaltenen Werten läßt sich eine Extinktionsgerade mit der Gleichung: $y = 50,98 \cdot x$ erstellen (Abb. 3).

In den elf Käsen, die in der Nachuntersuchung als listenhaltig befunden worden waren, führte der jeweilige Vergleich der Extinktionswerte der unerhitzten und der für fünf Minuten auf 70°C erhitzten Probe zu folgendem Ergebnis:

In allen vier Weichkäsen mit Schmiere und in vier der sie-

ben Sauermilchkäse mit Schmiere war keine Phosphataseaktivität feststellbar (die Extinktionswerte schwankten bei beiden Erhitzungsvarianten um den Null-Wert). Sie waren ebenso wie ein weiterer Sauermilchkäse, der nur mikrobielle Phosphatase enthielt (die Extinktionswerte entsprachen sich bei beiden Erhitzungsvarianten), aus ausreichend pasteurisierter Milch hergestellt worden.

In den beiden anderen Sauermilchkäsen war neben der mikrobiellen Phosphatase auch Milchphosphatase vorhanden (der Extinktionswert der unerhitzten Probe übertraf den der erhitzten Probe). Die zu ihrer Herstellung verwendete Milch war nicht ordnungsgemäß pasteurisiert worden.

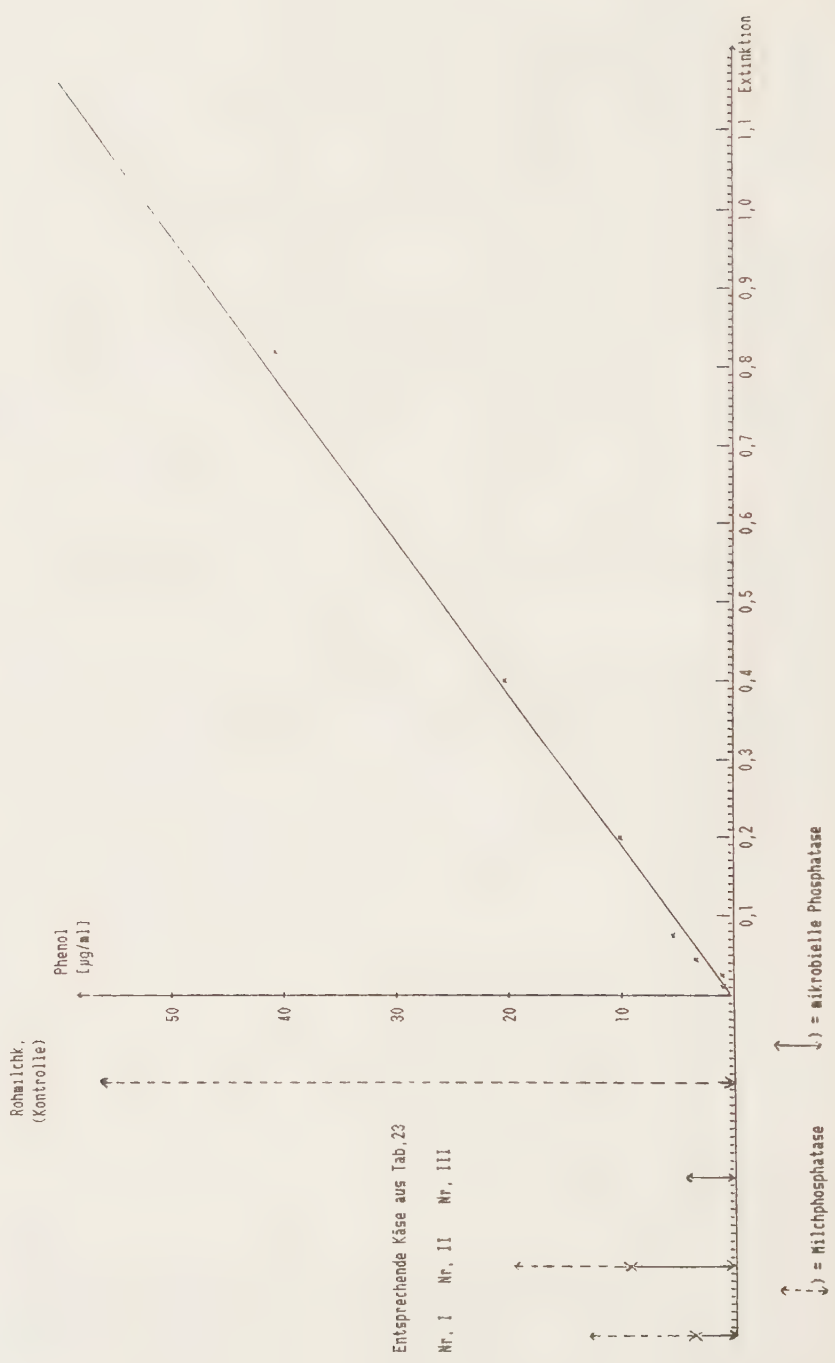
Neun der elf in dieser Untersuchung überprüften Käse waren also aus ordnungsgemäß pasteurisierter Milch hergestellt worden. Bei zwei Käsen war dies nicht der Fall.

Erwartungsgemäß war bei den beiden als Kontrollen beigefügten Weichkäsen mit Schimmel Milchphosphatase vorhanden (Käse aus Rohmilch hergestellt) bzw. keine Phosphataseaktivität feststellbar (Käse aus wärmebehandelter Milch hergestellt).

Tabelle 23: Untersuchung von drei Käsen mit erhöhten Werten an alkalischer Phosphatase zur Ermittlung des Ursprungs des Enzyms

Probe	Säunulige Erhitzung auf 70°C		keine Erhitzung		in der Probe enthaltene Phosphatase	Verwendung von ordnungsgemäß pasteurisierter Milch bei der Herstellung des Käses
	Extinktionswerte (gebildetes Phenol in [µg/ml])	(gebildetes Phenol in [µg/ml]) Mittelwert	Extinktionswerte (gebildetes Phenol in [µg/ml])	(gebildetes Phenol in [µg/ml]) Mittelwert		
Sauermilchkäse mit Schmelze						
Nr. I	+ 0,078 (3,97)	+ 0,258 (13,15)	{+ 0,183 / + 0,333}		mikrobielle u. Milchphosphatase	nein
Nr. II	+ 0,182 (9,27)	+ 0,383 (19,52)	{+ 0,337 / + 0,429}		mikrobielle u. Milchphosphatase	nein
Nr. III	+ 0,081 (4,12)	+ 0,081 (4,12)	{+ 0,067 / + 0,095}		mikrobielle Phosphatase	ja
aus Rohmilch her- gestellter Weich- käse mit Schmelze (Kontrolle)	0,000	+ 1,106 (56,38)	{+ 1,058 / + 1,154}		Milchphosphatase	nein

Abbildung 3: Phenol-Standard-Kurve (Tab. 22) mit graphischer Darstellung der Werte von Tab. 23



3.3.2 Listeriennachweis in zerkleinerten Fleisch- und Wurstproben

3.3.2.1 Isolierung

Von den 200 untersuchten Fleisch- und Wurstproben erwiesen sich 73 (36,5 %) als listerienhaltig, wobei es sich bei 32 Proben (16 %) um *L. monocytogenes* handelte. Betroffen waren insgesamt 34 der 50 Hackfleisch-, 15 der 50 Tatar-, 20 der 50 Mettwurst- und 4 der 50 Schinkenplockwurstproben, wovon 15, 8, 6 bzw. 3 der Proben *L. monocytogenes* enthielten. Außer *L. monocytogenes* wurden *L. innocua* und *L. seeligeri* isoliert. Andere *Listeria*-Spezies kamen nicht vor. In 13 Proben wurden zwei *Listeria*-Spezies gleichzeitig nachgewiesen (Tab. 24).

Eine gegenüberstellende Auflistung der positiven Proben und der jeweiligen Geschäfte, in denen die Proben gekauft wurden, ergab kein besonderes Verteilungsmuster.

Tabelle 24: Vorkommen von Listerien in Fleisch
und Fleischwaren

	Hackfleisch	Tatar	Mettwurst	Schinken- plockwurst	Summe
Anzahl unter- suchter Proben	50	50	50	50	200
(%)	(25,0)	(25,0)	(25,0)	(25,0)	(100)
davon					
Listerien-	34	15	20	4	73
positiv	(68,0)	(30,0)	(40,0)	(8,0)	(36,5)
L. monocytogenes	15	8	6	3	32
(gesamt)	(30,0)	(16,0)	(12,0)	(6,0)	(16,0)
- L. monocytogenes	7	7	4	3	21
(Monokultur)	(14,0)	(14,0)	(8,0)	(6,0)	(10,5)
- L. monocytogenes-	6	1	2	-	9
L. innocua-	(12,0)	(2,0)	(4,0)		(4,5)
Mischkultur					
- L. monocytogenes-	2	-	-	-	2
L. seeligeri-	(4,0)				(1,0)
Mischkultur					
L. innocua	17	4	13	1	35
(Monokultur)	(34,0)	(8,0)	(26,0)	(2,0)	(17,5)
L. seeligeri	2	1	1	-	4
(Monokultur)	(4,0)	(2,0)	(2,0)		(2,0)
L. innocua-	-	2	-	-	2
L. seeligeri-		(4,0)			(1,0)
Mischkultur					

In Tab. 25 wird die Effektivität der einzelnen Anreicherungsansätze hinsichtlich der Ermittlung listerienhaltiger Produkte verglichen.

Nur in 21,9 % der Fleisch- und Wurstproben wurden bei allen drei Ansätzen Listerien nachgewiesen.

Durch Ansatz A (25 g Probe + 225 ml EB) wurden 44 der 73 listerienpositiven Proben (60,3 %) erfaßt, durch Ansatz B (1 ml von Ansatz A 1:10 mit EB verdünnt) nur 25 (34,2 %) und durch Ansatz C (10 ml von Ansatz A 1:10 mit EB verdünnt) 64 (87,7 %).

Tabelle 25: Effektivität der einzelnen Anreicherungsvarianten bei Nachweis von Listerien in Fleisch und Fleischwaren

Ansatz A	Ansatz B	Ansatz C	
225 ml EB + 25 g Probe + Ausstrich direkt u. indirekt nach KOH-Be- handlung	1 ml von Ansatz A 1:10 mit EB verdünnt + Ausstrich direkt	10 ml von Ansatz A 1:10 mit EB verdünnt + Ausstrich direkt	Anzahl listerienpositiver Fleisch- u. Wurstproben
+	+	+	16
+	+	-	1
+	-	+	22
+	-	-	5
-	+	+	5
-	+	-	3
-	-	+	21

			Summe: 73

+) Isolierung erfolgt

-) keine Isolierung

3.3.2.2 Bestimmung der Listerienmenge

Die Bestimmungen der Listerienmenge in den Fleisch- und Wurstproben ergaben, daß zwei Hackfleisch-, sechs Tatar-, zwei Mettwurst- und drei Schinkenplockwurstproben weniger als 1 Keim/g Probe beinhalten. In sechs Hackfleisch-, einer Tatar- und drei Mettwurstproben lag die Listerienzahl zwischen 1 und 10 Keimen/g. Die höchste Listerienmenge in einer Schinkenplockwurstprobe betrug 2,5 Keime/g. Listerienmengen zwischen 10 und 10^2 Keimen/g konnten bei einer Hackfleisch- und fünf Mettwurstproben ermittelt werden; eine weitere Hackfleischprobe sowie drei Tatarproben enthielten sogar $2,0 \times 10^2$ bis $4,5 \times 10^3$ Listerien/g. *L. monocytogenes*-haltige Proben wiesen in den allermeisten Fällen nur geringe Keimzahlen mit bis zu 4,5 Keimen/g auf. Nur in drei Fällen wurden höhere Zahlen mit 15, 25 und $9,5 \times 10^2$ Keimen/g (aus einer Mettwurst-, Hackfleisch- bzw. Tatarprobe) ermittelt (Tab. 26).

Tabelle 20: Höchstwahrscheinliche Listerienzahl pro Gramm
Probenmaterial in 34 listerienhaltigen
Fleisch- und Wurstproben

Bereiche von Listerien- gehalten / g	Listerien / g in			
	Hackfleisch	Tatar	Mettwurst	Schinken- plockwurst
< 1	< $0,3 \times 10^{-1}$ *	< $0,3 \times 10^{-1}$ *	0,4	< $0,3 \times 10^{-1}$ *
	0,45	< $0,3 \times 10^{-1}$	0,9 **	< $0,3 \times 10^{-1}$
		0,4 *		0,4 *
		0,45 *		
		0,9		
		0,95		
1 - 10	1,5 *	9,5	2,5	2,5 *
	1,5		9,5	
	4,5 **		9,5	
	4,5			
	7,5			
	9,5			
> 10 - 1×10^2	25,0 *		15,0 *	
			20,0	
			25,0	
			40,0	
			75,0	
> 1×10^2	$2,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$		
		$9,5 \times 10^2$ **		
		$4,5 \times 10^3$		

*) L. monocytogenes-haltige Probe (Monokultur)

**) L. monocytogenes-haltige Probe (Mischkultur)

4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, deutsche Käsesorten auf das Vorkommen von Listerien zu untersuchen und stichprobenweise zu prüfen, ob für die Käseherstellung ordnungsgemäß pasteurisierte Milch verwendet wurde. Da nach der Literatur vermutet werden konnte, daß auch Fleisch und Fleischwaren Listerien enthalten können, sollte in orientierenden Untersuchungen festgestellt werden, wieweit auch hierzulande diese Produkte mit Listerien belastet sind.

Zunächst sei vorweggenommen, daß Angaben vor allem der älteren Literatur zu *Listeria*-Isolierungen, sowohl quantitativer als auch qualitativer Art, kritisch zu werten sind, da zum einen die Listeriendiagnostik im Laufe der Zeit verbessert wurde und zum anderen auch die Aufgliederung der Gattung *Listeria* in verschiedene Spezies immer weiter fortschritt. Dies ist auch bei Vergleichen von eigenen Ergebnissen mit denen aus der Literatur zu berücksichtigen.

In den 23 untersuchten Schnittkäsen und halbfesten Schnittkäsen ließen sich im Gegensatz zu Weich- und Sauermilchkäsen keine Listerien nachweisen. Mit abnehmendem Wassergehalt (a_w -Wert) des Käses wird die Kontamination mit Listerien offensichtlich seltener.

Auch andere Autoren stellten bei Käse mit niedrigem a_w -Wert eine geringere Nachweisquote von Listerien als in solchem mit hohem Wassergehalt fest. So fand BREER (1986a, 1986b) im Hart- bzw. Schnittkäse gar keine Listerien bzw. keine *L. monocytogenes* (1986c). Auch TERPLAN et al. (1986) konnten aus Hartkäse keine Listerien und aus 113 Schnittkäseproben in nur einem Fall Listerien (*L. innocua*) isolieren.

SCHOEN und TERPLAN (1987) wiesen jedoch später in drei Hartkäsen, wobei es sich allerdings bei zwei um Schafkäse handelte, Listerien nach. Auch GLEDEL (1986) fand in 4 %

der von ihm untersuchten Schnittkäse Listerien und damit mehr als in den anderen von ihm untersuchten Käseproben. BREER (1986b) verzeichnete bei den von ihm untersuchten listerienhaltigen Käsesorten bei halbfestem Schnittkäse mit 4,0 % positiven Proben den geringsten Prozentsatz, während TERPLAN et al. (1986) mit 8,8 % listerienpositiven Proben bei halbfestem Schnittkäse einen deutlich höheren Wert erzielten.

In den eigenen Untersuchungen waren Weichkäse mit 6,8 % und Sauermilchkäse mit 36,7 % positiven Proben die einzigen listerienhaltigen Käsesorten.

Auch bei TERPLAN et al. (1986) nahmen Weichkäse mit 11,3 % und Sauermilchkäse mit 54,5 % die Spitze bezüglich des Listerienbefalls unter den untersuchten Käsesorten ein.

Bei BREER (1986a, 1986b, 1986c) stellte Weichkäse ebenfalls jeweils die Käsesorte dar, die am häufigsten mit Listerien kontaminiert war, in Sauermilchkäse dagegen konnten Listerien (1986a) bzw. *L. monocytogenes* (1986c) nicht nachgewiesen werden. (Es ist nicht klar, ob BREER mit Sauermilchkäse nicht Frischkäse meint).

Eine Aufgliederung der Weichkäse in jene mit Oberflächenschmiere und solche mit Oberflächenschimmel ergab bei den eigenen Untersuchungen eine Listerien-Nachweisquote von 16,9 % bei denen mit Schmiere. In Weichkäse mit Schimmel konnten keine Listerien entdeckt werden.

Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von TERPLAN et al. (1986). Bei ihren Untersuchungen waren deutlich mehr Weichkäse mit Schmiere (31,3 %) als Weichkäse mit Schimmel (7,0 %) mit Listerien kontaminiert. Ähnliches stellte auch BREER (1986a, 1986b, 1986c) fest.

L. innocua dominierte in der eigenen Untersuchung mit 20 Isolierungen eindeutig, während *L. monocytogenes*, die pathogene Art, nur einmal, und zwar in einem Sauermilchkäse

mit Schmiere, nachgewiesen werden konnte. Auch bei TERPLAN et al. (1986) überwogen deutlich die nichtpathogenen Listerien; BREER (1986a, 1986b, 1986c) isolierte in etwa gleichviel *L. innocua*- wie *L. monocytogenes*-Stämme, während GLEDEL (1986) und JOHNSTON et al. (1986) vermehrt *L. monocytogenes* gegenüber *L. innocua* fanden.

Außer *L. monocytogenes* und *L. innocua* konnten aus den Käseproben der eigenen Untersuchung keine weiteren *Listeria*-Arten isoliert werden.

TERPLAN et al. (1986) verzeichneten unter ihren *Listeria*-Isolierungen aus Käse außerdem auch einige *L. seeligeri*-Stämme.

Ansonsten liegen in der Literatur keine weiteren Angaben hierüber vor.

Durch die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde nachgewiesen, daß sowohl aus Käseproben, die aus ungenügend erhitzter Milch, als auch Käseproben, die aus pasteurisierter Milch hergestellt worden waren, *Listerien* isoliert werden konnten.

Dieser Sachverhalt wurde auch von BREER (1986a, 1986b, 1986c), GLEDEL (1986) und TERPLAN et al. (1986) bestätigt. Aus diesen Untersuchungen allein läßt sich allerdings nicht schließen, ob die listerienhaltigen, aus pasteurisierter Milch hergestellten Käse nachträglich kontaminiert wurden oder ob die *Listerien* die Pasteurisierung der entsprechenden Milch überlebt hatten. Letzteres ist allerdings nicht anzunehmen, da die Pasteurisierung bei einer geringen *Listerien*zahl - wie hier vorliegend - zur Abtötung der Keime führt. Dies steht in Einklang mit Berichten aus der Literatur, wonach die Fähigkeit der Pasteurisierung zur Abtötung von *Listerien* grundsätzlich anerkannt (z.B. BRADSHAW et al., 1985) bzw. nur bei einer großen *Listerien*menge in Frage gestellt wird (z.B. BEARNS und GIRARD, 1958).

Das seltene Vorkommen von *L. monocytogenes* und das häufige-

re von *L. innocua*, also eines apathogenen Keimes, sprechen ebenfalls dafür, daß die Keime bei der Kaseherstellung nach der Milcherhitzung in die Produktionslinien gelangen. Dies bestätigen Stufenkontroll- und Umgebungsuntersuchungen, die von SCHOEN und TERPLAN (1987) in mehreren Käsereien, in deren Endprodukten jeweils zuvor Listerien nachgewiesen worden waren, durchgeführt wurden. Dabei wurden die Keime unter anderem im Schmierwasser, in einem Gulli in der Nähe der Schmiermaschine, im Salzbad, im Kühlschrank und auf Reifungsbrettern gefunden.

Auch die Tatsache, daß in der eigenen Arbeit bei der Nachuntersuchung von 18 Kase marken, die bei der ersten Untersuchung positiv waren, in zehn Fällen die gleiche Listerienart, davon in einem Fall zusätzlich mit einer anderen, reisoliert werden konnte, spricht für betriebsbedingte Kontamination.

Zudem ergab die Zuordnung der listerienpositiven Käseproben zu den Hersteller- bzw. Vertriebsfirmen (Tab. 18), daß listerienhaltige Produkte auf etwa 1/5 der untersuchten Firmen beschränkt waren. Auch JOHNSTON et al. (1986) stellten fest, daß die in ihren Untersuchungen listerienpositiven Käseproben alle aus dem gleichen Herstellungsbetrieb stammten. Damit scheint sich die These von BREER (1986b) und TERPLAN et al. (1986) zu bestätigen, wonach sich Listerien zur betriebseigenen Flora entwickeln können und es somit zu Kontamination eines Produktes auch nach der Pasteurisierung in jenen Betrieben kommen kann, in denen sich solche Listeriennester etabliert haben.

Das Ergebnis der quantitativen Listerienbestimmung läßt den Schluß zu, daß im Käse - selbst nach zwei- bis dreiwöchiger Kühlschranklagerung - im allgemeinen mit einer nur geringen Listerienmenge zu rechnen ist. Die Keimzahlen reichten von $< 0,3 \times 10^{-1}$ bis $9,5 \times 10^3$, wobei in knapp der Hälfte der Fälle die Keimzahl unter 10/g lag.

Auch in diesem Punkt konnte weitgehende Übereinstimmung mit

den Ergebnissen anderer Autoren erzielt werden (BREER, 1986a; BREER, 1986b; TERPLAN et al., 1986).

Nur BECKERS et al. (1987) stellten bei sieben von zehn L. monocytogenes-haltigen Käsen mit 10^3 - 10^6 Listerien pro Gramm Käse deutlich höhere Keimzahlen fest.

Die Untersuchung der Fleisch und Fleischwaren ergab, daß 68 % der Hackfleisch-, 30 % der Tatar-, 40 % der Mettwurst- und 8 % der Schinkenplockwurstproben mit Listerien bzw. zu 30 %, 16 %, 12 % und 6 % mit L. monocytogenes kontaminiert waren. Es ist erkennbar, daß nicht alle Fleisch- bzw. Wurstsorten gleichmäßig mit Listerien befallen waren, sondern daß es auch durchaus Sorten gibt, wie die Schinkenplockwurst, die für das Wachstum von Listerien ein weniger geeignetes Medium darstellen bzw. wo ursprünglich reichlicher vorkommende Keime dieser Gattung absterben.

Neben L. monocytogenes wurde vermehrt L. innocua, seltener L. seeligeri festgestellt. Auch Mischkulturen der genannten Arten kamen vor.

Ein Vergleich dieser beim ersten Anblick überraschend hoch erscheinenden Werte mit Angaben aus der Literatur fällt recht schwer, da diesbezüglich nur wenig Informationen vorliegen. Ein direkter Vergleich ist nur bei Hackfleisch möglich. BREER (1986c) fand in keiner der von ihm untersuchten Proben Listerien; LE GUILLOU (1980) entdeckte in 8,0 % seiner Proben L. monocytogenes und NICOLAS und VIDAUD (1985) isolierten aus 40,9 % ihres entsprechenden Untersuchungsmaterials Listerien bzw. in 26,2 % L. monocytogenes.

Als Anhaltspunkte können auch die Zahlen einiger Autoren über das Vorkommen von Listerien in ähnlichem Untersuchungsmaterial dienen. Während TERNSTRÖM und MOLIN (1987) aus rohem Fleisch keine L. monocytogenes isolieren konnten, gelang dies ELISCHEROVA et al. (1979) in 19,0 % der Rindfleisch- und in 17,1 % der Schweinefleischproben sowie LE GUILLOU (1980) in 6,8 % roher Fleischwaren.

NICOLAS und VIDAUD (1985) isolierten aus Fleischprodukten, die im Rohzustand verzehrt werden, in 32,4 % der Fälle Listerien bzw. in 21,6 % *L. monocytogenes* und aus rohen Fleischprodukten, die erst nach der Erhitzung verzehrt werden, in 24,2 % der Fälle Listerien bzw. in 10 % *L. monocytogenes*. Mitvertreten waren neben *L. monocytogenes* und *L. innocua* auch *L. welshimeri*-Stämme.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung liegen also durchaus im Rahmen der Literaturangaben.

Bei der Frage nach der Herkunft der Listerien in Fleisch und Fleischwaren, ist zunächst an das Ausgangsprodukt (Schlachttierkörper) zu denken. Literaturangaben zufolge sind im Fleisch (Muskulatur) selbst keine Listerien nachzuweisen (LE GUILLOU, 1980; COTTIN et al., 1985). Untersuchungen von ERTEL (1988) zeigen, daß jedoch auf der Oberfläche von Rinderschlachtkörpern (20 von 30) *L. innocua*, auf Schweineschlachtkörpern (14 von 30) *L. innocua* und *L. monocytogenes* zu finden waren. Umgebungsuntersuchungen von ERTEL in dem Schlachthof ergaben weitere positiven Befunde (Brühwasser, Fußboden, Hände von Metzgern). Eine sekundäre Kontamination des Fleisches ist demnach durchaus wahrscheinlich. RALOVICH et al. (1971) und WEISE (1973) isolierten aus Tonsillen mehrmals Listerien und vermuteten auch bei der Entnahme des Rachenringes eine Kontaminationsmöglichkeit. Ob diesem Übertragungsweg große Bedeutung zukommt, ist jedoch nicht sicher.

Auch bei der weiteren Fleischverarbeitung ist an die Möglichkeit der Kontamination von Produkten mit Listerien, die sich in ökologischen Nischen der Verarbeitungsräume befinden, zu denken.

ELISCHEROVA et al. (1979) konnten das Vorhandensein von *L. monocytogenes* an den Arbeitstischen und in der Umgebung eines Fleischverarbeitungsbetriebes eindrucksvoll nachweisen. Mehr als bei der Käseherstellung ist bei Fleisch bei der Verarbeitung, die im allgemeinen durch Arbeitsvorgänge ge-

kennzeichnet ist, bei denen es zu Zerkleinerungsvorgängen und zu einem intensiven Kontakt mit den Gerätschaftsoberflächen oder auch zu einem häufigeren manuellen Kontakt seitens des Personals kommt, mit einer Kontamination der Produkte zu rechnen.

Käse, dessen Herstellung größtenteils automatisiert ist, erhält meist alsbald durch die Verpackung einen gewissen Schutz, der bis hin zum Endverbraucher verbleibt. Fleisch und Fleischwaren unterliegen auch nach der Herstellung häufig manuellen Kontakten, bevor sie auf dem Ladentisch dem Konsumenten angeboten und übereignet werden. Angesichts der Tatsachen, daß Listerien zum einen ubiquitär verbreitet und zum andern ein hoher Prozentsatz klinisch gesunder Menschen Listerienträger und -ausscheider sind (KAMPELMACHER und NOORLE JANSEN, 1969; RALOVICH et al., 1970; KAMPELMACHER und NOORLE JANSEN, 1972; BERGER und PIETSCH, 1975; ORTEL, 1975b), ist auch diese Kontaminationsquelle in Betracht zu ziehen.

Die Ergebnisse der Bestimmungen der Listerienmengen pro Gramm Probenmaterial in Fleisch und Fleischwaren zeigen, daß auch hier nur geringe Zahlen vorliegen, die nahezu denen beim Käse gleichen. Die Werte reichten von $< 0,3 \times 10^{-1}$ bis $4,5 \times 10^3$, wobei in 70,5 % der Fälle die Keimzahl unter $10/g$ lag.

Bemerkenswert ist, daß Hackfleisch und Tatar keine höheren Keimzahlen als die Wurst- und Käseproben aufwiesen, obwohl sich bei den beiden trotz Külschranklagerung bis zum Beginn der Keimzählung schon leichte Anzeichen der Verderbnis zeigten.

Die in den eigenen Untersuchungen zur Listerienisolierung angewandte Methode entsprach im allgemeinen den Empfehlungen der FDA. Es wurde hierbei auf die Kälteanreicherung nach GRAY et al. (1948), die die Eigenschaft der Listerien, sich auch bei 4°C anzureichern, ausnutzt, wegen des für

Routineuntersuchungen zu langen zeitlichen Aufwandes (fünf Wochen) verzichtet. Mit der angewandten Isolierungsmethode konnten Ergebnisse erzielt werden, die mit denen anderer Autoren vergleichbar waren: Die eigenen Untersuchungen erfaßten insgesamt 10,5 % der Kaseproben als listerienhaltig, während andere Untersucher mit ihren Methoden 16,0 % (BREER, 1986a), 9,6 % (BREER, 1986b), 19,4 % (BREER, 1986c), 2,5 % (GLEDEL, 1986), 1,4 % (JOHNSTON et al., 1986) und 8,2 % (TERPLAN et al., 1986) als positiv erkannten.

Das in der FDA-Methode beschriebene Anreicherungsverfahren wurde teils geringfügig abgeändert, teils wesentlich erweitert: Auf den Ausstrich nach 24stündiger Anreicherung (FDA) wurde verzichtet, statt dessen wurden zusätzlich zum Ausgangsansatz (A: 25 g Probenmaterial in 225 ml EB) zwei weitere Ansätze (B: 1 ml von Ansatz A 1:10 mit EB verdünnt und C: 10 ml von Ansatz A 1:10 mit EB verdünnt) 48 Stunden lang bebrütet. Mit den erwähnten Verdünnungen sollte eine Ausdünnung der störenden Begleitflora (z.B. von Enterokokken) und des Untersuchungsmaterials selber erreicht werden. Tatsächlich wuchsen die Listerien bei den Ausstrichen der verdünnten Ansätze auch häufig in Reinkultur. Den beiden Ansätzen haftet allerdings der Nachteil an, daß theoretisch bei Ansatz B mindestens 10 Keime und bei Ansatz C mindestens 1 Keim initial pro Gramm Probenmaterial vorhanden sein müssen, um zu positiven Ergebnissen zu kommen. Es zeigte sich nun auch, daß mit Ansatz B in nur 47 Fällen Listerien aus den 105 positiven Käse-, Fleisch- und Wurstproben isoliert werden konnten, während mit Ansatz A und C 70 bzw. 90 Isolierungen möglich waren. Andererseits war jeder einzelne der Ansätze für sich allein für eine Anzahl an Listerienisolierungen verantwortlich, die durch die jeweils anderen Ansätzen nicht erfaßt wurden. Das Weglassen eines der Ansätze hätte also zu einer Verminderung der Gesamtzahl positiver Befunde geführt (Tab. 20 und 25).

Abschließend seien noch einige Gedanken vermerkt.

Die meisten Kaseproben und alle Fleisch- und Wurstproben waren handelsüblich in Geschäften gekauft worden. Die Ergebnisse geben somit einen Kontaminationsgrad der entsprechenden Nahrungsmittel mit Listerien wieder, mit dem auch der Konsument zu rechnen hat. Das häufige Vorkommen bei Fleisch und Fleischwaren sowie in einigen anderen Lebensmitteln, die ebenfalls noch häufiger als Käse kontaminiert sind (TERPLAN, 1988) lassen erkennen, daß es kaum vermeidbar ist, bei normalen Verzehrsgewohnheiten Listerien über den Nahrungsweg aufzunehmen. Von Käse scheint dabei - im Gegensatz zu anderslautenden Berichten in der Presse - noch eine geringere Gefahr auszugehen, wurde doch in den eigenen Untersuchungen in nur einer der 200 Käsemarken die für Menschen pathogene Art *L. monocytogenes* festgestellt; bei den Fleisch- und Wurstsorten wurden die pathogenen *L. monocytogenes* hingegen aus großen Teilen des Untersuchungsmaterials isoliert. Dies ist umso bedeutsamer, da nur Hackfleisch vor dem Verzehr erhitzt wird, Mettwurst und Schinkenplockwurst dagegen - stellvertretend für andere Wurstsorten - sowie auch Tatar (je nach den Verzehrsgewohnheiten in den verschiedenen Landstrichen der Bundesrepublik Deutschland) ohne weitere Behandlung, die auf *L. monocytogenes* abtötend wirkt, verzehrt werden, wodurch es bei den letztgenannten Nahrungsmitteln auch unmittelbar vor dem Genuß zu keiner Eliminierung dieser Keime kommt. Da die Listeriose jedoch für bestimmte Personengruppen unter Umständen eine lebensbedrohliche Erkrankung sein kann und über Dosis-Wirkungsbeziehungen (minimale Infektionsdosis) sowie Virulenzfaktoren nichts bekannt ist, um gezielte diagnostische bzw. Abwehr-Maßnahmen zu treffen, sollte deshalb angestrebt werden, das Vorkommen von *L. monocytogenes* in Nahrungsmitteln zu verhindern oder zumindest so gering wie möglich zu halten.

Gefordert sind verbesserte Hygienemaßnahmen in den Nahrungsmittel erzeugenden Betrieben, allerdings müßten

diese auch auf den Haushalt des Konsumenten ausgedehnt werden. Es muß verhindert werden, daß sich Listerien als Bestandteil der betriebseigenen Flora etablieren können. Bereits in den Betrieben vorhandene Listeriennester müssen aufgedeckt und wirksam bekämpft werden. Weiterhin ist auch daran zu denken, daß sich bei der Kühlagerung von Nahrungsmitteln bereits vorhandene Listerien anreichern können. Aus einer ursprünglich geringen Listerienmenge, wie sie den eigenen Untersuchungen zufolge häufig anzutreffen ist, könnte sich bei langer Lagerung im Kühlschrank evt. eine größere, möglicherweise infektionstüchtige Menge entwickeln.

Da über die Infektionsbedingungen (Infektionsmenge; sonstige Faktoren, die zu Erkrankung führen) zur Zeit wenig bekannt ist, kann Risikopatienten, das heißt Patienten, die nach den Erkenntnissen der Wissenschaft besonders für eine Listerieninfektion empfänglich sind, vorerst nur geraten werden, auf den Genuß von Nahrungsmitteln, bei denen mit gehäuftem Vorkommen von *L. monocytogenes* gerechnet werden muß, zu verzichten bzw. sie nur nach Erhitzen (z.B. Fleischwaren) oder nach einer gewissen Vorbereitung (z.B. Entfernen der Rinde bei Käse) zu verzehren.

Die Wissenschaft ist deshalb aufgerufen, durch Untersuchungen die Produkte aufzudecken, bei denen am ehesten die Gefahr besteht, daß sie Listerien enthalten könnten. Hierzu gehört auch, daß die Nachweismethoden für Routineuntersuchungen weiter verbessert und deren Dauer verkürzt werden.

Wichtig ist auch, bei Listerienisolierungen eine eindeutige Differenzierung zwischen *L. monocytogenes* und den apathogenen *Listeria*-Spezies vorzunehmen. Hierzu wäre eine Erarbeitung von weiteren Pathogenitätskriterien, die eine Zuordnung zu pathogenen oder apathogenen Stämmen erleichtern, seitens der Wissenschaft wünschenswert.

Und schließlich sollten den Nahrungsmittel erzeugenden Betrieben Empfehlungen gegeben werden, mit welchen Maßnahmen *L. monocytogenes* aus den Produktionsanlagen sowie den Pro-

dukten selbst eliminiert und auf Dauer verbannt werden kann.

5. Zusammenfassung

In 200 inländischen Käseproben des Handels (6 Schnittkäse, 17 halbfeste Schnittkäse, 147 Weichkäse und 30 Sauermilchkäse) konnten 21mal Listerien nachgewiesen werden, darunter in 10 Weichkäsen, 9 Sauermilchkäsen mit Rotschmiereoberfläche und 2 Sauermilchkäsen mit Schimmeloberfläche. Nur in einem Fall handelte es sich um *L. monocytogenes* (Sauermilchkäse mit Rotschmiere). Bei den restlichen wurde die apathogene Spezies *L. innocua* gefunden.

Die Listerienzahlen reichten von $< 0,3 \times 10^{-1}$ bis $9,5 \times 10^2$, wobei in knapp der Hälfte der Fälle die Keimzahl unter $10/g$ lag.

Die Nachuntersuchung jeweils einer weiteren Probe der ursprünglich 18 listerienpositiven Produkte erbrachte in neun Fällen die gleiche Listerienart wie bei der Erstuntersuchung, in zwei Fällen wurde eine andere Listerienart als vorher gefunden und bei sieben Produkten war das Ergebnis negativ.

Die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase bei listerienpositiven Stichproben ließ auf die Herstellung der Käse teils aus nicht pasteurisierter bzw. teils aus pasteurisierter Milch schließen.

Aus 200 inländischen Fleisch- und Wurstproben (je 50 Proben Hackfleisch, Tatar, streichfähige Mettwurst und Schinkenplockwurst) konnten insgesamt 73mal Listerien isoliert werden, und zwar Hackfleisch 34, Tatar 15, Mettwurst 20 und Schinkenplockwurst 4. Die 32 *L. monocytogenes*-Isolierungen verteilten sich wie folgt: Hackfleisch 15, Tatar 8, Mettwurst 6 und Schinkenplockwurst 3. Insgesamt wurden 46mal *L. innocua* und achtmal *L. seeligeri* isoliert. In 13 Fällen

lagen Mischkulturen der erwähnten einzelnen Spezies vor.

Die ermittelten Listeriengehalte betrugen von weniger als $0,3 \times 10^{-1}$ bis $4,5 \times 10^3$, wobei in 70,5 % der Fälle die Keimzahl unter 10/g lag.

Die Isolierung von Listerien erfolgte in Anlehnung an die Methode der FDA, wobei auf den Ausstrich nach 24stündiger Anreicherung verzichtet und dafür der Ausgangsansatz für die 48stündige Anreicherung um zwei "Verdünnungs"-Ansätze (1 ml bzw. 10 ml des Ausgangsansatzes 1:10 mit Anreicherungsbouillon verdünnt) erweitert wurde. Aufgrund der dadurch bedingten "Ausdünnung" störender Begleitkeime wurde der Listeriennachweis erheblich verbessert, so daß die Listerien bei den Anreicherungsvarianten häufig nahezu in Reinkultur wuchsen.

Summary

Occurrence of *Listeria* in cheese, meat and meat products.

200 commercially available samples of domestic cheese (6 semi-hard cheeses, 17 semi-soft cheeses, 147 soft cheeses and 30 acid curd cheeses) were investigated for the presence of *Listeria*. The microorganisms of this genus could be detected in 10 soft cheeses, 9 acid curd cheeses with red smear surface and 2 with mould surface, *L. monocytogenes* only in one cheese (acid curd cheese with red smear). The other samples contained the nonpathogenic species *L. innocua*.

The counts of *Listeria* ranged from $< 0,3 \times 10^{-1}$ to $9,5 \times 10^3$. In about 50 % of the samples the counts were lower than 10/g.

The reinvestigation of 18 products previously *Listeria*-positive revealed in 50 % the same species and in 2 samples other species as detected before. In 7 samples *Listeria* spp. couldn't be found any longer.

Determinating the activity of alkaline phosphatase the cheeses were found to be produced from pasteurized milk as well as from unpasteurized.

73 out of 200 retail samples of domestic meat and meat products (50 samples of minced meat, 50 samples of "Tatar", 50 samples of "Mettwurst" and 50 samples of "Schinkenplockwurst") were contaminated with *Listeria*. 34 samples of minced meat, 15 samples of "Tatar", 20 samples of "Mettwurst" and 4 samples of "Schinkenplockwurst" contained *Listeria* and 15, 8, 6 and 3, respectively, of them *L. monocytogenes*. 46 of the isolated strains belonged to *L.*

innocua and 8 to *L. seeligeri*. In 13 samples two of these species occurred simultaneously.

The counts of *Listeria* varied between $< 0,3 \times 10^{-1}$ and $4,5 \times 10^3$. In 70,5 % of the samples lower counts than 10/g were found.

For the detection and enumeration of *Listeria* the method recommended by the FDA was used, omitting, however, the plating after 24 hours. On the other hand two additional enrichment steps were performed to the original 48-hour-culture (1 ml and 10 ml from the original dilution, respectively, were diluted 1:10 with enrichment broth). This "dilution" resulted in the reduction of interfering bacteria and improved the detection of *Listeria*, as they often grew in pure culture.

6. Literaturverzeichnis

AMTSBERG, G., A. ELSNER, H.A. GABBAR und W. WINKENWERDER
(1969):

Die epidemiologische und lebensmittelhygienische Bedeutung
der Listerieninfektion des Rindes.

Dtsch. tierarztl. Wschr. 76, 497-501

AMTSBERG, G. (1980):

Listerien.

In: BLOBEL, H. und T. SCHLIEBER: Handbuch der bakteriellen
Infektionen bei Tieren, Bd. II, p. 345-438

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

ANONYM (1986a):

Listeriosis transmitted by contaminated Jalisco-Brand
cheese.

J. Food Prot. 49, 311

ANONYM (1986b):

FDA's Dairy Product Safety Initiatives,
Preliminary Status Report.

Food and Drug Administration, Washington DC.

BARBER, M. (1939):

A comparative study of *Listerella* and *Erysipelothrix*.

J. Path. Bact. 48, 11-23

BARZA, M. (1985):

Listeriosis and milk.

N. Engl. J. Med. 312, 438-40

BEARNS, R.E. and K.F. GIRARD (1958):

The effect of pasteurization on *Listeria monocytogenes*.

Can. J. Microbiol. 4, 55-61

BECKERS, H.J., P.S.S. SOENTORO and E.H.M. DELFGOU-VAN ASCH (1987):

The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat.

Int. J. Food Microbiol. 4, 249-256

BERGER, U. und U. PIETSCH (1975):

Untersuchungen zur Häufigkeit der Listerien-Keimtrager.

Med. Microbiol. Immunol. 161, 63-71

BISPING, W. (1957):

Die Listeriose und ihre milchhygienische Bedeutung.

Kieler Milchwirt. Forschungsber. 2, 595-606

BRADSHAW, J.G., J.T. PEEBLER, J.J. CORWIN, J.M. HUNT and R.M. TWEDT (1987):

Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products.

J. Food Prot. 50, 543-544

BRADSHAW, J.G., J.T. PEEBLER, J.J. CORWIN, J.M. HUNT, J.T. TIERNEY, E.P. LARKIN and R.M. TWEDT (1985):

Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk.

J. Food Prot. 48, 743-745

BRER, C. (1986a):

Das Vorkommen von Listerien in Käse.

Proc. 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Vol. 1, Berlin (West), 230-233

DERSELBE (1986b):

Listeria in cheese.

WHO Consultation on Prevention and Control of Listeriosis, Berlin (West)

DERSELBE (1986c):

Untersuchungen über das Vorkommen von Listerien in
Nahrungsmitteln.

Jahrestagung der Schweiz. Ges. f. Mikrobiol., Buchs,
Abstract

BUNNING, V.K., R.G. CRAWFORD, J.G. BRADSHAW, J.T. PEELER,
J.T. TIERNEY and R.M. TWEDT (1986):

Thermal resistance of intracellular *Listeria monocytogenes*
cells suspended in raw bovine milk.

Appl. Environ. Microbiol. 52, 1398-1402

BUNNING, V.K., C.W. DONNELLY, J.T. PEELER, E.H. BRIGGS,
J.G. BRADSHAW, R.G. CRAWFORD, C.M. BELIVEAU and
J.T. TIERNEY (1988):

Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within
bovine milk phagocytes.

Appl. Environ. Microbiol. 54, 364-370

COTTIN, J., H. GENTHON, C. BIZON et B. CARBONNELLE (1985):

Recherche de *Listeria monocytogenes* dans des viandes
prélevées sur 514 bovins.

Sci. Aliments, 5ⁿe hors série IV, 145-149

DEDIE, K. (1955):

Beitrag zur Epizootologie der Listeriose.

Arch. exp. Vet. Med. 2, 251-264

DEDIE, K. und D. SCHULZE (1957):

Die Hitzeresistenz von *Listeria monocytogenes* in Milch.

Berl. Münchn. tierärztl. Wschr. 70, 231-232

DIJKSTRA, R.G. (1971):

Investigations on the survival times of *Listeria* bacteria in suspensions of brain tissue, silage and faeces and in milk.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 216, 92-95

DERSELBE (1975):

Recent experiences on the survival times of *Listeria* bacteria in suspensions of brain, tissue, silage, faeces and in milk.

Proc. 6th International Symposium on Listeriosis, ed. by M. WOODBINE, Nottingham 1974, Leicester University Press, 71-74

DOMINGUEZ, L., J.F. FERNANDEZ, J.A. VAZQUEZ, J.L. BLANCO, E. RODRIGUEZ FERRI et G. SUAREZ (1985):

Effet des traitements thermiques sur les *Listeria*.

9th International Symposium on the Problems of Listeriosis, Nantes

DONKER-VOET, J. (1958):

Serological studies on some strains of *Listeria*.
monocytogenes especially type IV strains.

In: ROOTS, E. und D. STRAUCH: *Listeriosen*, Symposium 1957, p. 37-44

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

DIESELBE (1959):

A serological study on some strains of *Listeria*
monocytogenes isolated in Michigan.

Am. J. Vet. Res. 20, 176-179

DIESELBE (1966):

A serological study on some strains of *Listeria monocytogenes*.

Proc. 3rd International Symposium on Listeriosis,
ed. by the ORGANIZING COMMITTEE, Bilthoven 1966, 133-137

DIESELBE (1972):

Listeria monocytogenes: some biochemical and serological aspects.

Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 19, 287-291

DONNELLY, C.W. and E.H. BRIGGS (1986):

Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition.

J. Food Prot. 49, 994-998 u. 1002

DONNELLY, C.W., E.H. BRIGGS and L.S. DONNELLY (1987):

Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two methods.

J. Food Prot. 50, 14-17 u. 20

DOYLE, M.P. and J.L. SCHOENI (1987):

Comparison of procedures for isolating *Listeria monocytogenes* in soft, surface-ripened cheese.

J. Food Prot. 50, 4-6

DOYLE, M.P., L.M. MESKE and E.H. MARTH (1985):

Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of nonfat dry milk.

J. Food Prot. 48, 740-742

DOYLE, M.P., K.A. GLASS, J.T. BEERY, G.A. GARCIA,
D.J. POLLARD and R.D. SCHULTZ (1987):

Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization.

Appl. Environ. Microbiol. 53, 1433-1438

ELISCHEROVA, K., S. STUPALOVA and J. STEPANEK (1979):
Some ecological aspects of *Listeria monocytogenes* in meat
industry.

Proc. 7th International Symposium on Listeriosis, ed. by
I. IVANOV, Varna 1977, 148-155

ERTEL, D. (1988):

Diss. med vet. München in Vorbereitung

FARBER, J.M., G.W. SANDERS, D.B. EMMONS and R.C. McKELLAR
(1987):

Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in artificially-
inoculated and naturally-contaminated raw milk.

74th Annual Meeting of the International Association of
Milk, Food and Environmental Sanitarians, Inc.

Ref. in: J. Food Prot. 50, 441

FARCHMIN, G. (1963):

Das Verhalten der Listerien bei den verschiedenen
Zubereitungsmethoden der Fleisch- und Wurstwaren.

Z. gesamte Hyg. 2, 616-618

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F., L. DOMINGUEZ-RODRIGUEZ,
J.A. VAZQUEZ BOLAND, J.L. BLANCO CANCELO et G. SUAREZ
FERNANDEZ (1986):

Listeria monocytogenes dans le lait pasteurisé.

Can. J. Microbiol. 32, 149-150

FIEDLER, F. and J. SEGER (1983):

The murein types of *Listeria grayi*, *Listeria murrayi* and
Listeria denitrificans.

System. Appl. Microbiol. 4, 444-450

FLEMING, D.W., S.L. COCHI, K.L. MacDONALD, J. BRONDUM,
P.S. HAYES, B.D. PLIKAYTIS, M.B. HOLMES, A. AUDURIER,
C.V. BROOME and A.L. REINGOLD (1985):

Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak
of listeriosis.

N. Engl. J. Med. 312, 404-407

GASPAROVIC, E. (1988):

Diss. med. vet. München in Vorbereitung

GLEDEL, J. (1986):

Epidemiology and significance of listeriosis in France.

WHO Consultation on Prevention and Control of Listeriosis,
Berlin (West)

GORET, P. et J. OUDAR (1965):

Les listérioses animales. Fréquence et incidence éventuelle
chez l'homme.

Revue de Pathologie comparée 65, 603-626

GOUET, Ph., J. LABADIE and C. SERRATORE (1978):

Development of *Listeria monocytogenes* in monoxenic and
polyxenic beef minces.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 166, 87-94

GRAY, M.L. (1963):

Epidemiological aspects of listeriosis.

Am. J. Publ. Hlth. 53, 554-563

GRAY, M.L., H.J. STAFSETH, F. THORP, L.B. SHOLL and
W.F. RILEY (1948):

A new technique for isolating *Listerellae* from the
bovine brain.

J. Bacteriol. 55, 471-476

HENRY, B.S. (1933):

Dissociation of the genus *Brucella*.

J. Infect. Dis. 52, 374-402

HOF, H. (1984):

Virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a.

Med. Microbiol. Immunol. 173, 207-218

HOF, H., H.P.R. SEELIGER, A. SCHRETTENBRUNNER and

S. CHATZIPANAGIOTOU (1986):

The role of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in foodborne infections.

Proc. 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Vol. 1, Berlin (West), 220-223

IKONOMOV, L. (1969):

Microbiological studies on the pasteurization of ewes' milk. VI. Comparison of effects on HTST pasteurization at different temp..

Vet. Med. Nauki, Sof. 6 (6), 71-76

Ref. in: Dairy sci Abstr. 32 (1970), 116-117, Nr. 741

IKONOMOV, L. and D. TODOROV (1964):

Studies of the viability of *Listeria monocytogenes* in ewes' milk and dairy products.

Vet. Med. Nauki, Sof. 1 (7), 23-29

Ref. in: Dairy sci Abstr. 27 (1965), 82, Nr. 571

DIESELBEN (1967):

Microbiological studies on the pasteurization of ewes' milk. III. Resistance of some pathogenic bacteria.

Vet. Med. Nauki, Sof. 4 (3), 99-108

Ref. in: Dairy sci. Abstr. 29 (1967), 568, Nr. 3995

JAMES, S.M., S.L. FANNIN, B.A. AGEE, B. HALL, E. PARKER,
J. VOGT, G. RUN, J. WILLIAMS, L. LIEB, C. SALMINEN,
T. PRENDERGAST, S.B. WERNER and J. CHIN (1985):
Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese -
California.
Morbidity Mortality Weekly Report 34, 357-359

JENTZSCH, K.D. (1958):
Zur fleischbeschaulichen Beurteilung listeriosekranker
Schlachttiere.
Mh. Vet. Med. 13, 679-684

JOHNSON, J.L., M.P. DOYLE and R.G. CASSENS (1986):
Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef.
Unveröffentlichter Vortrag (73rd Annual Meeting of the
International Association of Milk, Food and Environmental
Sanitarians, Inc.)

JOHNSON, J.L., M.P. DOYLE, R.G. CASSENS and J.L. SCHOENI
(1988):
Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally
infected cattle and in hard salami.
Appl. Environ. Microbiol. 54, 497-501

JOHNSTON, M.A., A. LOIT, U. PURVIS and J. FARBER (1986):
Surveillance of soft and semi-soft cheese for *Listeria*.
Unveröffentlichter Vortrag (73rd Annual Meeting of the
International Association of Milk, Food and Environmental
Sanitarians, Inc.)

JULIANELLE, L.A. and C.A. PONS (1939):
Immunological and serological reactions of *Listerella*
monocytogenes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 40, 364-365

KAMPELMACHER, E.H. (1958):

Die Rolle der Lebensmittel tierischen Ursprungs in der
Listeriose-Epidemiologie.

In: ROOTS E. und D. STRAUCH: Listeriosen, Symposion 1957,
p. 106-109

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

KAMPELMACHER, E.H. and L.M. v. NOORLE JANSEN (1969):

Isolation of *Listeria monocytogenes* from faeces of
clinically healthy humans and animals.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 211, 353-359

DIESELBEN (1972):

Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in
clinically healthy individuals.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221, 70-77

KHAN, M.A., C.V. PALMAS, A. SEAMAN and M. WOODBINE (1973):

Survival versus growth of a facultative psychrotroph.

Meat and products of meat.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 157, 277-282

KHAN, M.A., I.A. NEWTON, A. SEAMAN and M. WOODBINE (1975):

The survival of *Listeria monocytogenes* inside and outside
its host.

Proc. 6th International Symposium on Listeriosis, ed. by.

M. WOODBINE, Nottingham 1974, Leicester University Press,

75-83

KNORZ, W. und H. HOF (1986):

Zur Pathogenität von Listerien.

Immun. Infekt. 86 (2), 76-80

KUZMINSKIJ, A.S. (1956):

Zur Epidemiologie einer Häufung von Listerien-Erkrankungen.

Zurn. microbiol. 27 (8), 25-30

Zit. n. TEMPER, K. (1961):

Über das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* bei not- und krankgeschlachteten Haustieren.

Arch. Lebensmittelhyg. 12, 1-4

LARSEN, H.E. and H.P.R. SEELIGER (1966):

A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp.n..

Proc. 3rd International Symposium on Listeriosis,

ed. by the ORGANIZING COMMITTEE, Bilthoven 1966, 35-39

LECOS, C.W. (1986):

A closer look at dairy safety.

FDA Consumer, April 1986, 14-17

LE GUILLOU, M. (1980):

Listeria monocytogenes. Sa fréquence dans les produits de charcuterie.

Bull. Soc. vét. prat. 64 (1), 45-53

Zit. n. NICOLAS, J.A. et N. VIDAUD (1985):

Contribution à l'étude des *Listeria* présentés dans les denrées d'origine animale destinées à la consommation humaine.

9th International Symposium on the Problems of Listeriosis, Nantes

MURRAY, E.G.D., R.A. WEBB and M.B.R. SWANN (1926):

A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.).

J. Path. 29, 407-439

NICOLAS, J.A. et N. VIDAUD (1985):

Contribution à l'étude des *Listeria* présentés dans les denrées d'origine animale destinées à la consommation humaine.

9th International Symposium on the Problems of Listeriosis, Nantes

OBIGER, G. (1976):

Untersuchungen über die Thermostabilität bedeutsamer Infektionserreger unter den Bedingungen der Milchpasteurisation.

Arch. Lebensmittelhyg. 27, 137-144

OZGEN, H. (1951):

Über die *Listeria monocytogenes*.

Diss. med. vet. Gießen

ORTELL, S. (1975a):

Schwangerschaftslisteriose und Listerienausscheider bei Laboratoriumspersonal.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 231, 491-502

DERSELBE (1975b):

Listerienausscheider und ihre epidemiologische Bedeutung.

Munch. med. Wschr. 117, 1145-1148

PATERSON, J.S. (1940):

The antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*.

J. Path. 51, 427-436

FATOCKA, F. E. MENCIKOVA, H.P.R. SEELIGER and A. JIRASEK (1979):

Neurotropic activity of a strain of *Listeria innocua* in suckling mice.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 243, 490-498

PIRIE, J.H.H. (1927):

A new disease of veld rodents. "Tiger River disease".
Publications of South African Institute for Medical
Research 3, 163-186

DERSELBE (1940):

Listeria: change of name for a genus of bacteria.
Nature 145, 264

POTEL, J. (1950/51):

Die Morphologie, Kultur und Tierpathogenität des
Corynebacterium infantisepticum.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 156, 490-493

DERSELBE (1953/54):

Ätiologie der Granulomatosis Infantiseptica.
Wiss. Z. Univ. Halle III M, 341-364

DERSELBE (1955):

Sechs Jahre Listeriose-Forschung und Diagnose mit
besonderer Berücksichtigung der Neugeborenen-Listeriose.
Arch. Hyg. 139, 245-264

DERSELBE (1968):

Die Listeriose unter besonderer Berücksichtigung der
Epidemiologie.
Fleischwirtsch. 48, 301-306

PRENTICE, G.A. and P. NEAVES (1986):

Listeria monocytogenes in food: its significance and
methods for its detection.
Milk Marketing Board, Surrey

PREVOT, A.-R. (1961):

Traité de Systématique Bactérienne, Vol. 2, p. 512
Dunod, Paris

RALOVICH, B., A. FORRAY, E. MERÖ and H. MALOVICS (1970):
Additional data on diagnosis and epidemiology of *Listeria*
infections.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 214, 231-235

RALOVICH, B., A. FORRAY, E. MERÖ, H. MALOVICS and
I. SZAZADOS (1971):

New selective medium for isolation of *L. monocytogenes*.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 216, 88-91

ROCOURT, J. (1986):

Identification of *Listeria* isolates.

WHO Consultation on Prevention and Control of Listeriosis,
Berlin (West)

ROCOURT, J. and P.A.D. GRIMONT (1983):

Listeria welshimeri sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov..

Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 866-869

ROCOURT, J. und A. SCHRETTENBRUNNER (1985):

Listeria seeligeri.

medwelt 36, 1522-1525

ROCOURT, J., A. SCHRETTENBRUNNER et H.P.R. SEELIGER (1983):

Différenciation biochimique des groupes génomiques de
Listeria monocytogenes (sensu lato).

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 134 A, 65-71

ROCOURT, J., U. WEHMEYER and E. STACKEBRANDT (1987):

Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia*
gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov..

Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 266-270

ROCOURT, J., F. GRIMONT, P.A.D. GRIMONT and H.P.R. SEELIGER (1982):

DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes* sensu lato.

Curr. Microbiol. 7, 383-388

ROCOURT, J., U. WEHMEYER, P. COSSART and E. STACKEBRANDT (1987):

Proposal to retain *Listeria murrayi* and *Listeria grayi* in the genus *Listeria*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 298-300

ROSENOW, E.M. and E.H. MARTH (1987):

Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C.

J. Food Prot. 50, 452-459

RUDELT, H. (1960):

Die Listeriose und ihre Bedeutung für die Fleischhygiene.

Mh. Vet. Med. 15, 810-813

RYSER, E.T. and E.H. MARTH (1987a):

Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese.

J. Food Prot. 50, 7-13

DIESELBEN (1987b):

Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camembert cheese.

J. Food Prot. 50, 372-378

RYSER, E.T., E.H. Marth and M.P. DOYLE (1985):

Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese.

J. Food Prot. 48, 746-750 u. 753

SCHOEN, R. und G. TERPLAN (1987):

Weitere Untersuchungen zum Vorkommen von Listerien in Milch und Milchprodukten und anderen Lebensmitteln.

18. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, 242-247

SCHOOP, G. (1951):

Listeria monocytogenes, ein Krankheitserreger unserer Haustiere.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 58, 293-294

SCHULZE, D. (1957):

Untersuchungen über die Hitzeresistenz von Listerien mit besonderer Berücksichtigung der Milchpasteurisierung.

Diss. med. vet. Leipzig

SEELIGER, H.P.R. (1961):

Listeriosis, p. 107-108 u. 178-179

Verlag S. Karger, Basel - New-York

DERSELBE (1981):

Apathogene Listerien: *L. innocua* sp.n. (SEELIGER et SCHOOF, 1977).

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 242, 487-493

DERSELBE (1984a):

Modern taxonomy of the *Listeria* group.

Relationship to its pathogenicity.

Clin. Invest. Med. 7, 217-221

DERSELBE (1984b):

Listeriosis, some newer aspects.

Infectious Diseases Newsletter 3 (10), 71-73

DERSELBE (1986):

Classification and pathogenicity of *Listeria*.

WHO Consultation on Prevention and Control of Listeriosis,
Berlin (West)

SEELIGER, H.P.R. und G. LINZENMEIER (1953):

Die Listeriose und ihre Erreger (*List. monocytogenes*).

Z. Hyg. 136, 335-378

SEELIGER, H.P.R. and K. HÖHNE (1979):

Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species.

In: BERGAN, T. and J.R. NORRIS: *Methods in Microbiology*,
Vol. 13, p. 31-49

Academic Press, London - New York - Toronto - Sydney -
San Francisco

SEELIGER, H.P.R. and D. JONES (1986):

Genus *Listeria* Pirie 1940, 383^{AL}.

In: BERGEY'S *MANUAL of Systematic Bacteriology*, Vol. 2,
p. 1235-1245

SEELIGER, H.P.R., J. ROCOURT, A. SCHRETTENBRUNNER,

P.A.D. GRIMONT and D. JONES (1984):

Listeria ivanovii sp.nov..

Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 336-337

SIELAFF, H. (1966):

Die lebensmittelhygienische Bedeutung der Listeriose.

Mh. Vet. Med. 21, 750-758 u. 792-796

SIPKA, M., S. ZAKULA, I. KOVINCIC and B. STAJNER (1974):

Secretion of *Listeria monocytogenes* in cow's milk and its
survival in white brined cheese.

XIX International Dairy Congress 1E, 157

Ref. in: Dairy sci Abstr. 37 (1975), 181, Nr. 1776

SKOVGAARD, N. (1986):

(*Listeria*. Food of animal origin).

Meat and meat products.

WHO Consultation on Prevention and Control of Listeriosis,
Berlin (West)

STAJNER, B., S. ZANULA, I. KOVINCIC and M. GALIC (1979):

Heat resistance of *Listeria monocytogenes* and its survival
in raw milk products.

Veterinarski Glasnik 33 (2), 109-112

Ref. in: Dairy sci Abstr. 43 (1981), 346, Nr. 2793

STENBERG, H. und T. HAMMAINEN (1955):

Über die Resistenz der *Listeria monocytogenes* gegen
Kochsalz und Wärmeeinwirkung bei Versuchen in vitro und
über die bei weissen Mäusen experimentell hervorgerufene
Monocytose.

Nord. Vet.-Med. 7, 853-868

STUART, S.E. and H.J. WELSHIMER (1973):

Intrageneric relatedness of *Listeria* Pirie.

Int. J. Syst. Bacteriol. 23, 8-14

DIESELBEN (1974):

Taxonomic reexamination of *Listeria* Pirie and transfer of
Listeria grayi and *Listeria murrayi* to a new genus,
Murrraya.

Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 177-185

TEMPER, K. (1961):

Über das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* bei not- und
krankgeschlachteten Haustieren.

Arch. Lebensmittelhyg. 12, 1-4

TERNSTRÖM, A. and G. MOLIN (1987):

Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

J. Food Prot. 50, 141-146 u. 149

TERPLAN, G. (1988):

personliche Mitteilung

TERPLAN, G., R. SCHOEN, W. SPRINGMEYER, I. DEGLE und H. BECKER (1986):

Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in Milch und Milchprodukten.

Arch. Lebensmittelhyg. 37, 131-137

WARNECKE, B. (1963):

Die Züchtung der *Listeria monocytogenes*.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 182, 162-177

WEISE, E. (1973):

Vorkommen von *Listeria monocytogenes* bei normal geschlachteten Schweinen.

15. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, 88-93

WELSHIMER, H.J. and A.L. MEREDITH (1971):

Listeria murrayi sp.n.: a nitrate-reducing mannitol-fermenting *Listeria*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 3-7

ZELLER, M. (1949):

Die morphologischen und kulturell nachweisbaren biologischen Eigenschaften der *Listeria monocytogenes* (Murray) Pirie.

Diss. med. vet. Gießen

ZINK, A., G.C. deMELLO and R.L. BURKHART (1951):
Listeriosis - field and laboratory studies, and aureomycin
activity.
Am. J. vet. Res. 12, 194-198

Herrn Professor Dr. G. Terplan möchte ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Bei der wissenschaftlichen Assistentin des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, Frau Dr. R. Schoen, bedanke ich mich ganz herzlich für die wertvollen Ratschläge und der stets gewährten liebenswürdigen Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Den Veterinäroffizieren Herrn Dr. R. Wermter und Herrn Dr. S. Henkel danke ich aufrichtig für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes beim Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr München sowie für ihre hilfreichen Anregungen.

Für die stete Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, insbesondere bei Frau Schäffer und Frau Schmidt, sowie bei den Mitarbeitern des Zentralen Instituts des Sanitätsdienstes der Bundeswehr München, hier insbesondere bei Frau Kiesewetter und Herrn Helfer, bedanken.

Lebenslauf

Name: Erdle

Vorname: Erhard

Geburtsdatum: 06.05.1960

Geburtsort: Krumbach/Schwaben

Familienstand: ledig

Eltern: Willibald Erdle, Landwirt in Rente
Anna Erdle, geb. Schedel

Schulbildung
und Studium: 1966 - 1971 Volksschule in Aichen
1971 - 1980 Gymnasium, Maristenkolleg
Mindelheim
27.06.1980 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
1980 - 1985 Studium der Tiermedizin an
der Tierärztlichen Fakultät
der LMU München

Approbation: 20.01.1986

Wehrpflicht: Januar 1986 - März 1987

Berufliche
Tätigkeit: seit Juni 1986: Doktorand am Lehrstuhl
für Hygiene und Technologie der Milch der
Tierärztlichen Fakultät der LMU München

